



XXV CONVEGNO NAZIONALE S.I.P.I.

Società Italiana di Patologia Ittica

**ITS Fondazione G. Caboto, Palazzo della Cultura - Via Annunziata, 58
GAETA (LT), 10-12 ottobre 2019**



Atti del

**XXV CONVEGNO
NAZIONALE S.I.P.I.**

Società Italiana di Patologia Ittica

GAETA (LT), 10-12 ottobre 2019

Palazzo della Cultura - Via Annunziata, 58

In collaborazione con
ITS Fondazione G. Caboto
Scuola Superiore di Tecnologia per il Mare

Comitato organizzatore:

Stefano Bronchini
Andrea Gustinelli
Marino Prearo
Giuseppe Scaturro
Alessandra Silvagni
Anna Toffan

Comitato scientifico:

Paola Beraldo
Andrea Fabris
Maria Letizia Fioravanti
Gabriella Gaglio
Andrea Gustinelli
Fabio Marino
Marino Prearo
Francesco Quaglio
Tommaso Scanzio
Anna Toffan

Segreteria:

Manuela Dalla Pozza
Alessandra Silvagni
Anna Toffan

Con il contributo di:



LA CASSETTA IN CANADÀ
di Amato Giuseppe & C.
Eccellenti per natura

PROGRAMMA

Giovedì 10 ottobre 2019

09.00-09.30 **Registrazione dei partecipanti**

09.30-10.15 **Apertura dei lavori e saluti delle autorità**

Pietro Lo Coco, Amministratore Delegato Gruppo del Pesce
Cesare d'Amico, Presidente ITS Fondazione G. Caboto - Scuola Superiore di
Tecnologia per il Mare
Cosmo Mitrano, Sindaco di Gaeta

10.15-11.30 - **I sessione lavori scientifici – Malattie virali**

Moderatore: dott. Enrico Volpe

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

10.15-10.30 **VALUTAZIONE DELL'EFFETTO VIRUCIDA DI UN DISINFETTANTE COMMERCIALE VERSO DUE CEPPI DEL VIRUS DELL'ENCEFALO-RETINOPATIA VIRALE - O1**

Errani F., Volpe E., Zamparo S., Ciulli S.

10.30-10.45 **IL LOMPO (*CYCLOPTERUS LUMPUS*) È SENSIBILE ALLA ENCEFALO-RETINOPATIA VIRALE? – O2**

Toffan A., De Salvador M., Scholz F., Pretto T., Buratin A., Rodger H.D., Toson M., Cuenca A., Vendramin N.

10.45-11.00 **INFEZIONE SPERIMENTALE IN LARVE DI ORATA (*SPARUS AURATA*) CON BETANODAVIRUS (RGNNV/SJNNV) – O3**

Pascoli F., Pretto T., Panzarin V.M., Biasini L., Abbadi M., Buratin A., Marsella A., Toffan A.

11.00-11.15 **INFEZIONE DA BETANODAVIRUS (RGNNV/SJNNV) IN LARVE DI ORATA (*SPARUS AURATA*): UNO STUDIO IMMUNOISTOCHEMICO – O4**

Pretto T., Marsella A., Toffan A., Pascoli F.

11.15-11.30 **STUDIO DI PATOGENICITÀ DI DIVERSI CEPPI DI RGNNV/SJNNV IN SPIGOLA (*DICENTRARCHUS LABRAX*): RISULTATI PRELIMINARI – O5**

Toffan A., Biasini L., Marsella A., Abbadi M., Toson M., Pretto T., Buratin A., Pascoli F.

11.30-12.00 **Coffee break**

12.00-13.30 - **II sessione lavori scientifici – Malattie batteriche e antibiotico resistenza**

Moderatore: dott.ssa Eleonora Focchi

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

12.00-12.15 **ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DI *CARNOBACTERIUM* SPP. IN SALMERINI DI FONTE CATTURATI IN LAGHI D'ALTA QUOTA – O6**

Pastorino P., Colussi S., Menconi V., Levetti S., Mugetti D., Esposito G., Pizzul E., Acutis P.L., Prearo M.

12.15-12.30 ***YERSINIA RUCKERI* IN STORIONE SIBERIANO (*ACIPENSER BAERII*): DESCRIZIONE DI UN EPISODIO IN UN ALLEVATO NEL NORD ITALIA – O7**

Salogni C., Accini A., Alborali G.L.

12.30-12.45 ***MYCOBACTERIUM PSEUDOSHOTTSHII*: AGGIORNAMENTO DEI NUOVI CASI IN ITALIA E ANALISI ISTOLOGICA IN OMBRINA OCELLATA (*SCIAENOPS OCELLATUS*) – O8**

Mugetti D., Varello K., Arillo A., Menconi V., Pastorino P., Levetti S., Cappelleri A., Dondo A., Bozzetta E., Prearo M.

12.45-13.00 **ANTIBIOTICO RESISTENZA IN CEPPI DI *AEROMONAS* SPP. ISOLATI IN PESCE ROSSO (*CARASSIUS AURATUS*) – O9**

Leveti S., Barbero R., Mugetti D., Menconi V., De Vita V., Pastorino P., Arsieni P., Dondo A., Prearo M.

13.00-13.15 **MIC (MINIMAL INHIBITORY CONCENTRATION) NEI CONFRONTI DEI PRINCIPALI BATTERI PATOGENI DEI PESCI: VALUTAZIONE DEGLI EPIDEMIOLOGICAL CUT-OFF – O10**

Manfrin A., Fiocchi E., Cocchi M., Deotto S., Michieletti G., Toson M., Zambon M., Boscarato M., Pretto T.

13.15-13.30 **PRODOTTI NATURALI MARINI (MNPs) COME NUOVE SOSTANZE AD AZIONE ANTIBATTERICA DA UTILIZZARE NELL'ALLEVAMENTO DI BRANZINO (*DICENTRARCHUS LABRAX*) E ORATA (*SPARUS AURATA*) – O11**

Bulfon C., Pacorig V., Zamperoni D., D'Ippolito G., Nuzzo G., Volpatti D., Fiocchi E., Pretto T., Manfrin A., Fontana A., Galeotti M.

13.30-14.45 **Light lunch**

14.45-15.15 **Lettura magistrale**

LUCI E OMBRE SULLE PATOLOGIE CARDIACHE DEL PESCE SPADA (*XIPHIAS GLADIUS*)

Guarda F., Mugetti D., Prearo M., Capucchio M.T.

15.15-16.45 - **III sessione lavori scientifici – Malattie parassitarie**

Moderatore: dott.ssa Rubina Sirri

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

15.15-15.30 **TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF *AMYLOODINIUM OCELLATUM* TOMONTS REVEALED BASIC INFORMATION ON THE MAJOR POTENTIAL VIRULENT FACTORS – O12**

Byadgi O., Marroni F., Dirks R., Massimo M., Volpatti D., Galeotti M., Beraldo P.

15.30-15.45 **ASPETTI IMMUNOLOGICI RELATIVI ALLA PROTEZIONE DEL BRANZINO (*D. LABRAX*) CONTRO *AMYLOODINIUM OCELLATUM* MEDIANTE VACCINAZIONE INTRACELOMATICA – O13**

Volpatti D., Massimo M., Bulfon C., Byadgi O., Galeotti M., Beraldo P.

15.45-16.00 **UN APPROCCIO MULTIMODALE MIRATO ALL'APPROFONDIMENTO DELLE INTERAZIONI OSPITE-PARASSITA IN BRANZINO INFETTATO DA *AMYLOODINIUM OCELLATUM* – O14**

Massimo M., Volpatti D., Calligaro C., Byadgi O., Galeotti M., Ireland J.H., Bron J.E., Beraldo P.

16.00-16.15 **AGGIORNAMENTI SULLA CRYPTOSPORIDIOSI NEI PESCI D'ALLEVAMENTO – O15**

Mazzone A., Caffara M., Fioravanti M.L.

16.15-16.30 **EFFETTO ANTIPARASSITARIO DI ESTRATTI DI *JUGLANS REGIA* E *CESTRUM PARQUI* SU *SPARICOTYLE CHRYSOPHRII*: DATI PRELIMINARI – O16**

Scaturro G., Romanelli A., Carella F., Zarrelli A., De Vico G.

16.30-16.45 **AGGIORNAMENTO SULLA PREVALENZA DI *DIPHYLLOBOOTHRIUM LATUM* NELLE PRINCIPALI ZONE SOGGETTE A PESCA COMMERCIALE DEL LAGO DI ISEO – O17**

Menconi V., Levetti S., Momo I., Pastorino P., Mugetti D., Gamberi A., Saragaglia C., Arsieni P., Ferrari A., Prearo M.

16.45-17.15 **Coffee break**

17.15- 18.00 - **IV sessione lavori scientifici – Malattie fungine**

Moderatore: dott.ssa Gabriella Gaglio
Università di Messina

17.15-17.30 **STUDIO DEI FATTORI DI RISCHIO PER SAPROLEGNIOSI IN TROTTICOLTURA – O18**

Tedesco P., Fioravanti M.L., Dieguez-Urbeondo J., Sandoval-Sierra J.V., Menconi V., Cook A. C., Alves M. T., Galuppi R.

17.30-17.45 **LOCALIZZAZIONE OCULARE DI *DERMOCYSTIDIUM* SP. IN UNA CARPA KOI (*CYPRINUS CARPIO* var. KOI) – O19**

Sirri R., Gustinelli A., Rubini S., Quaglio F., Fioravanti M.L.

17.45-18.00 **EPISODIO DI MORTALITÀ IN GAMBERI DI FIUME (*AUSTROPOTAMOBIVUS PALLIPES*) STABULATI A FINI DI RIPOPOLAMENTO – O20**

Volpe E., Fiocchi E., Tosi F., Pretto T., Cappai N., Manfrin A., Ciulli S.

18.00-18.30 **Assemblea dei soci SIPI**

Venerdì 11 ottobre 2019

08.30-10.00 - **V sessione lavori scientifici – Patologie multifattoriali e miscellanea**

Moderatore: dott. Paolo Pastorino

Istituto Zooprofilattico del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta

- 08.30-08.45 **"SMALL VESSEL DISEASE" O "CORONARY MICROVASCULAR DISEASE": IL PESCE SPADA COME MODELLO DI PATOLOGIA COMPARATA – O21**
Capucchio M.T., Chiappino L., Sereno A., Mugetti D., Mignone W., Garibaldi F., Prearo M., Guarda F.
- 08.45-09.00 **LEIOMIOMA IN RIPRODUTTORE DI SPIGOLA (*DICENTRARCHUS LABRAX*) – O22**
Iaria C., Capparucci F., Natale S., Panebianco R., Puleio R., Marino F.
- 09.00-09.15 **CO-INFEZIONI MULTIPLE E STRESS AMBIENTALI RESPONSABILI DI UN FOCOLAIO DI MORTALITÀ CRONICA IN GIOVANILI DI STORIONE – O23**
Ciulli S., Volpe E., Errani F., Tura G., Renzi A., Toffan A., Pretto T., Mordenti O., Sirri R., Sarli G., Serratore P., Mandrioli L.
- 09.15-09.30 **1000 WAYS TO DIE IN AQUATIC ANIMALS – O24**
Corti I., Lanteri G., Malandra R., De Vico G., Marino F.
- 09.30-09.45 **CO-INFEZIONE DA *MYCOBACTERIUM* SP., *HAPLOSPORIDIUM PINNAE* E ALTRI PATOGENI IN ESEMPLARI DI *PINNA NOBILIS* IN ITALIA E SPAGNA (MAR MEDITERRANEO): QUALI LE CAUSE DELLA MORTALITÀ? – O25**
Carella F., Antuofermo E., Farina S., Salati F., Mandas D., Prado P., Marino F., Fiocchi E., Pretto T., Susini F., De Vico G.
- 09.45-10.00 **Presentazione della Piscicoltura del Golfo Gaeta – Scaturro Giuseppe**
- 10:00-11:00 Premiazioni:**
Premio miglior tesi di laurea/specializzazione
Premio miglior tesi di dottorato
Premio miglior poster e miglior presentazione
Premio Pietro Ghittino 2019 - Miglior giovane ricercatore under 40
Premio Ettore Grimaldi 2019 - Migliore pubblicazione scientifica di giovani ricercatori under 40

Chiusura lavori

11.00-11.30 Coffee break

POSTER PRESENTATI:

- 1. INDAGINE SUL RUOLO DEL CORMORANO NELLA TRASMISSIONE DI ALCUNI VIRUS PATOGENI DEI PESCI IN PROVINCIA DI TRENTO**
Andreatta S., Franzago E., Dalla Pozza M., Toson M., Quartesan R., Bille L., Baldessari F., Giovannini R., Dellamaria D., Toffan A.
- 2. CONFRONTO TRA PREVALENZA ATTESA E PREVALENZA ATTUALE IN UNA POPOLAZIONE DI GIOVANILI DI STORIONE RUSSO (*ACIPENSER GUELLENSTAEDTII*) CON IRIDOVIRI**
Bona M.C., Ceresa L., Mugetti D., Righetti M., Pastorino P., Arsieni P., Ru G., Prearo M.
- 3. VALUTAZIONE DELLA PRESENZA DI CARP EDEMA VIRUS (CEV) IN CIPRINIDI DI DIFFERENTE PROVENIENZA: DATI PRELIMINARI**
Mugetti D., Giaccone F., Menconi V., Levetti S., Pastorino P., Arsieni P., Prearo M.
- 4. MATRICI “ATIPICHE” PER LA DIAGNOSI DI MICOBATTERIOSI ITTICHE: I FILTRI D’ACQUARIO**
Mugetti D., Pastorino P., Menconi V., Levetti S., Righetti M., Canola S., Dondo A., Prearo M.
- 5. INDAGINE SULLA PRESENZA DI BATTERI PATOGENI NEI PESCI ORNAMENTALI INTRODOTTI NEL LAZIO**
Mascolo D., Amati S., Bossù T., Corradini C.
- 6. VALUTAZIONE DELLE LESIONI GRANULOMATOSE DA BATTERI ACIDO-RESISTENTI IN SPIGOLE D’ALLEVAMENTO: UN PROBLEMA IGIENICO-SANITARIO EMERGENTE O RICORRENTE**
Natale S., Carella F., Capparucci F., Iaria C., Marino F.
- 7. RICERCA DI MICOBATTERI NON TUBERCOLARI IN POPOLAZIONI SELVATICHE DI SALMERINO DI FONTE (*SALVELINUS FONTINALIS*) IN AMBIENTI LACUSTRI DI ALTA QUOTA**
Pastorino P., Mugetti D., Menconi V., Esposito G., Pizzul E., Prearo M.
- 8. MONITORAGGIO DELLO STATO SANITARIO DI *PERCA FLUVIATILIS* NEL LAGO D’ISEO**
Leveti S., Menconi V., Pastorino P., Mugetti D., Barbero R., Arsieni P., Saragaglia C., Prearo M.
- 9. IMPORTANZA DELLA PROFILASSI SULLE MALATTIE PARASSITARIE IN PESCI UTILIZZATI A FINI SPERIMENTALI**
Menconi V., Caimi C., Pastorino P., Barbero R., Righetti M., Levetti S., Varello K., Saragaglia C., Perolo A., Ferrari A., Gasco L., Dondo A., Prearo M.

- 10. MONITORAGGIO DELL'INFESTAZIONE DA APOROCOTYLIDAE IN ORATE (*SPARUS AURATA*) ALLEVATE IN GABBIA IN LIGURIA**
Gustinelli A., Sirri R., Yezza M.A., Quaglio F., Bruno G., Lavagna S., Fioravanti M.L.
- 11. LOCALIZZAZIONE ATIPICA DI *PENNELLA SPP.*: NUOVI RITROVAMENTI IN CUORI DI PESCE SPADA**
Mugetti D., Menconi V., Mignone W., Garibaldi F., Chiappino L., Sereno A., Capucchio M.T., Guarda F.
- 12. INDAGINE PRELIMINARE SULL'ELMINTOFAUNA DI CERNIE BRUNE (*EPINEPHELUS MARGINATUS*)**
De Benedetto G., Morello D., Arfuso F., Iaria C., Marino F., Gaglio G.
- 13. RECENTI FOCOLAI DI MALATTIA NODULARE BRANCHIALE IN ALCUNE TROTTICOLTURE UMBRO-MARCHIGIANE**
Agnetti F., Ciavarella R., Epifanio E.M., Rogato F., Valentini A., Zamparo S., Ghittino C.
- 14. INDAGINE SULLA PATOGENESI DELLA MALATTIA NODULARE BRANCHIALE NELLA TROTA IRIDEA (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)**
Perolo A., Dalla Pozza M., Toson M., Gustinelli A., Fioravanti M.L., Quaglio F.
- 15. RISCONTRO DI *PSEUDOCAPILLARIA TOMENTOSA* IN ZEBRAFISH PROVENIENTI DA ESERCIZI COMMERCIALI**
Capparucci F., De Benedetto G., Iaria C., Natale S., Gaglio G., Marino F.
- 16. STUDIO PRELIMINARE DEI CASI DI MORTALITA' DI RICCI (*PARACENTROTUS LIVIDUS*) IN CAMPANIA E SARDEGNA: LA *BALD DISEASE***
Carella F., Farina S., Miele C., Guala I., Grech D., Zupo V., De Vico G.
- 17. VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI GENI DSCAM (*DOWN SYNDROME CELL ADHESION MOLECULE*) IN GIOVANILI DI *CRASSOSTREA GIGAS* ESPOSTI A INFEZIONE DA OSHV-1 A DIFFERENTI TEMPERATURE**
Carella F., Aceto S., Bellot O., Bertomeu E., Gras N., Gairin I., Andree K.B., Furones D., De Vico G., Carrasco N.
- 18. STUDIO SULLA PRESENZA DEL PROTOZOO *MARTEILIA REFRINGENS* IN ALLEVAMENTI CAMPANI CON RELATIVI IMPATTI ECOLOGICI E ZOOTECNICI**
Carella F., Aceto S., Villari G., Iaccarino D., Maresca F., Lucibelli G., De Vico G., Di Nocera F.
- 19. STUDIO SULLA PRESENZA DI *APHANOMYCES ASTACI* (OOMYCETES, LEPTOLEGNIACEAE) IN POPOLAZIONI DI GAMBERI DULCIACQUICOLI DELL'ITALIA SETTENTRIONALE**
Tomasoni M., Gustinelli A., Fioravanti M.L., Tosi F., Quaglio F., Fea G., Ghia D., Pretto T.

20. INFESTAZIONI DA *MARITREMA OOCYSTA* (DIGenea: MICROPHALLIDAE) IN *PALAEMON SPP.* (DECAPODA: PALAEMONIDAE) DELLE VALLI DI COMACCHIO

Massanova O., Gustinelli A., Caffara M., Quaglio F., Trevisanato R., Pretto T., Fioravanti M.L.

21. BIOCIDI INNOVATIVI ED ECOSOSTENIBILI: EFFETTI DEL DETAROX® AP SUI BIOMARKERS DI STRESS OSSIDATIVO IN *SINANODONTA WOODIANA*

Magara G., Sangsawang A., Menconi V., Kovitvadhi U., Caldaroni B., Salvatori A., Scoparo M., Pastorino P., Barbero R., Dörr A.J.M., Gasco L., Prearo M., Elia A.C.

22. VALUTAZIONE ISTOLOGICA DEL FEGATO DI RANE PESCATRICI (*LOPHIUS PISCATORIUS*) COMMERCIALIZZATE PRESSO IL MERCATO ITTICO DI MILANO

Corti I., Ghisleni. G., Ranghieri V., Malandra R.

23. OSSERVAZIONI SULLE PATOLOGIE CARDIACHE DEL CIRCOLO CORONARICO DEL PESCE SPADA (*XIPHIAS GLADIUS*)

Guarda F., Mugetti D., Pastorino P., Mignone W., Garibaldi F., Chiappino L., Sereno A., Capucchio M.T.

Workshop ECM

Progetti H2020

La ricerca europea al servizio dell'acquacoltura

11.00-11.30 Registrazione Workshop

11.30-12.00 Saluto delle autorità

Dott. Marino Prearo, Istituto Zooprofilattico del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino

Dott. Andrea Fabris, Direttore API

Sessione ParaFishControl

Moderatore: dott. Amedeo Manfrin

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

12.00-12.30 Updates on zoonotic parasites in marine farmed fish

Maria Letizia Fioravanti, Università degli studi di Bologna

12.30-13.00 Strategia vaccinale e aspettative per il controllo dell'amyloodiniosi in acquacoltura

Paola Beraldo, Università degli studi di Udine

13.00-14.00 Light lunch

14.00-14.30 Enterospora: news and views

Oswaldo Palenzuela, Spanish National Research Council - CSIC

14.30-15.00 Updates on Sparicotylosis in Mediterranean mariculture

Ivona Mladineo, Croatian Institute of Oceanography and Fisheries – IZOR

Sessione PerformFISH

Moderatore: dott. Amedeo Manfrin

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

15.00-15.30 Key performance indicators (KPIs) for sea bass and sea bream industry

Giovanna Marino, ISPRA

15.30-16.00 Operational Welfare Indicators (OWIs) for sea bass and sea bream: results from PerformFISH consultation

Tommaso Petochi, ISPRA

16.00-16.30 - Coffee break

16.30-17.00 **Bioindicatori della qualità larvale di teleostei marini allevati**
Valentina Pacorig, Università degli studi di Udine

Sessione MedAID

Moderatore: dott. Amedeo Manfrin
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

17.00-17.30 **Mediterranean Aquaculture Integrated Development**
Anna Toffan, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

17.30-18.00 **The importance of communication and harmonized procedures for disease control - Result of WP4 - Health management and diseases and fish welfare**
Snjezana Zrncic, Croatian Veterinary Institute - CVI

18.00-18.30 Discussione e test finale di apprendimento

20.00 **Cena sociale** presso il ristorante Aeneas' Landing, Gaeta

Sabato 12 ottobre 2019

10.00-12.00 **Study Visit alla piscicoltura del Golfo**
Ritrovo alle 09:30 Lungomare Caboto, di fronte alla Guardia Costiera

ABSTRACT
Comunicazioni orali

VALUTAZIONE DELL'EFFETTO VIRUCIDA DI UN DISINFETTANTE COMMERCIALE VERSO DUE CEPPI DEL VIRUS DELL'ENCEFALO-RETINOPATIA VIRALE

Errani F.¹, Volpe E.¹, Zamparo S.², Ciulli S.¹

¹Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Cesenatico (FC); ²Università degli Studi di Udine.

L'encefalo-retinopatia virale (ERV) rappresenta una delle principali malattie virali che colpiscono il settore dell'acquacoltura marina. Tra le specie ittiche più colpite vi sono il branzino europeo (*Dicentrarchus labrax*) e l'orata (*Sparus aurata*). L'agente causale di questa malattia è il virus della necrosi nervosa virale (NNV), virus a ssRNA del genere *Betanodavirus*, famiglia *Nodaviridae*. Si tratta di un virus di piccole dimensioni, con capsidi a simmetria icosaedrica e privo di envelope. I virioni dei betanodavirus sono molto resistenti nell'ambiente acquatico e il virus può sopravvivere per lunghi periodi in acqua di mare a bassa temperatura, anche in assenza di un ospite. Al momento non sono disponibili metodi terapeutici efficaci per limitare l'impatto dell'ERV, pertanto i metodi più utilizzati per controllarla si concentrano sulle misure profilattiche volte a prevenire l'ingresso, la diffusione e la sopravvivenza del virus all'interno dell'allevamento. In particolare, alla base delle buone pratiche igienico-sanitarie raccomandate per il controllo dell'ERV vi è l'utilizzo di prodotti disinfettanti per i quali sia stata dimostrata una comprovata efficacia verso questo virus.

L'obiettivo di questo studio è stato quello di misurare *in vitro* la capacità virucida di un disinfettante commerciale (Virkon® S) nei confronti di due ceppi di betanodavirus (RGNNV e RGNNV/SJNNV), che attualmente rappresentano quelli più diffusi nel bacino del Mediterraneo.

L'attività virucida è stata misurata utilizzando il protocollo europeo standardizzato UNI EN 14675 adattandolo all'impiego per i virus patogeni per gli animali acquatici. Inoltre sono state testate diverse condizioni di utilizzo quali dose, tempo di esposizione, presenza di sostanza organica e uso di acqua marina per verificare l'efficacia del disinfettante in condizioni simili a quelle di campo. I risultati sono stati analizzati dal punto di vista statistico al fine di rilevare se l'effetto virucida poteva essere condizionato da dose, presenza di sostanza organica e ceppo virale.

Il prodotto testato ha dimostrato capacità virucida in diverse condizioni di applicazione sia verso il ceppo classico RGNNV che verso il ceppo riassortante RGNNV/SJNNV. In particolare, il prodotto Virkon S® ha mostrato efficacia a concentrazioni raccomandate dal produttore (1%) anche in presenza di elevata carica di sostanze interferenti. Mentre in condizioni di bassa interferenza ha mostrato efficacia anche a concentrazioni più basse di quelle raccomandate (0,5%). L'analisi statistica ha dimostrato che la variabile che più influenza l'attività virucida del disinfettante è rappresentata dalla presenza di sostanza organica.

La comparazione dell'attività virucida del prodotto Virkon® S su due ceppi virali ha mostrato l'assenza di influenza significativa da parte del genotipo virale sulla riduzione del titolo virale a seguito del trattamento. L'applicazione di un unico protocollo di disinfezione efficace verso entrambi i genotipi può essere quindi di estrema utilità ai fini pratici.

Inoltre, questo studio ha confermato l'importanza di eseguire la pulizia degli strumenti e delle superfici prima che queste vengano sottoposte a disinfezione per evitare una diminuzione dell'azione virucida.

This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 727610 (PerformFISH). This publication reflects the views only of the authors and the European Commission cannot be held responsible for any use which may be made of the information contained therein.

IL LOMPO (*CYCLOPTERUS LUMPUS*) È SENSIBILE ALLA ENCEFALO-RETINOPATIA VIRALE?

Toffan A.¹, De Salvador M.², Scholz F.³, Pretto T.¹, Buratin A.¹, Rodger H.D.³, Toson M.¹, Cuenca A.⁴, Vendramin N.⁴

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe), Legnaro, Italia; ²Università di Udine, Italia ; ³FishVet Group Ireland, Oranmore, Co. Galway, Ireland; ⁴National Institute of Aquatic Resources, EURL for fish disease Technical University of Denmark, Kongens Lyngby, Denmark

I lompi (*Cyclopterus lumpus*) sono ampiamente utilizzati nell'allevamento del salmone atlantico (*Salmo salar*) nel Nord Europa per il controllo dei crostacei del genere *Lepeophtheirus*. Molto poco si conosce però relativamente alla patologie infettive di questa specie.

Recentemente in Svezia e Norvegia, sono state riportate le prime segnalazioni di positività al virus della Encefalo-Retinopatia Virale (VER) in labridi allevati e selvatici. Lompi e labridi condividono lo stesso ambiente e lo stesso utilizzo, ma al momento non ci sono dati sulla suscettibilità dei lompi alla VER.

Per questo motivo è stata valutata la suscettibilità di giovanili di lompo all'infezione con 3 diversi ceppi di *Betanodavirus* in condizioni sperimentali. I virus selezionati per il challenge appartengono a 2 diversi genotipi (RGNNV and BFNNV). In questo studio sono stati utilizzati 90 lompi, divisi in 3 vasche, infettati per via intramuscolare con 10⁵ TCID₅₀/ml di ogni ceppo virale. Sessanta lompi, divisi in 2 vasche, sono stati usati come controllo non infettato. La temperatura è stata mantenuta a 12° C per tutta la durata dello studio. La comparsa di segni clinici e la mortalità sono stati monitorati per 28 giorni e tutti i pesci con segni clinici sono stati soppressi e campionati. Una volta alla settimana, è stato campionato un pesce per ogni vasca sperimentale per monitorare il corso dell'infezione, e sono stati poi campionati tutti sopravvissuti al termine della prova. L'infezione sperimentale è stata eseguita presso il centro di Riferenza Europeo per le malattie dei pesci e dei crostacei (Copenhagen), mentre le analisi di laboratorio sono state effettuate presso l'IZSVe. I campioni di encefalo sono stati sottoposti a test molecolari, all'isolamento virale e ad analisi istologica e immunoistochimica (IHC). Nei primi 15 giorni post infezione, si è osservato un aumento della mortalità in tutte le vasche sperimentali (incluse quelle di controllo) attribuito al comportamento aggressivo dei lompi (tail biting), un problema ben noto in questa specie. Non sono stati mai osservati però segni neurologici. L'analisi dei campioni di cervello effettuata in real time ha evidenziato la positività di tutti i campioni analizzati, indipendentemente dal giorno del prelievo e dal virus di challenge, anche se con valori di Ct diversi. L'isolamento virus ha confermato i risultati ottenuti con le analisi biomolecolari ed ha rivelato un titolo virale più elevato nei gruppi infettati con i 2 virus BFNNV rispetto al virus RGNNV. Il titolo virale inoltre era molto più elevato nei sopravvissuti rispetto al titolo virale dei soggetti morti o soppressi. L'istologia e l'IHC hanno evidenziato i tipici vacuoli circondati da abbondanti immunoprecipitati nell'encefalo e negli occhi dei soggetti sopravvissuti e infettati con i ceppi BFNNV. Scarsa positività all'IHC, in assenza di lesioni istologiche, è stata osservata nei lompi infettati con il ceppo RGNNV.

In conclusione, la ridotta sopravvivenza osservata all'inizio dello studio non è stata attribuita a VER, ma a problematiche di tipo comportamentale. Tuttavia, sebbene non sia stata osservata la forma clinica della malattia, il lompo può essere ritenuto suscettibile alla VER come dimostrato dall'elevato titolo virale e dalle gravi lesioni rilevate nel cervello dei soggetti sopravvissuti. Saranno necessari ulteriori studi di più lunga durata e a diverse condizioni ambientali per determinare se *Betanodavirus* possa causare mortalità in questa specie.

INFEZIONE SPERIMENTALE IN LARVE DI ORATA (*SPARUS AURATA*) CON BETANODAVIRUS (RGNNV/SJNNV)

Pascoli F., Pretto T., Panzarin V.M., Biasini L., Abbadi M., Buratin A., Marsella A., Toffan A.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD).

L'orata (*Sparus aurata*) è sempre stata ritenuta resistente alla VER, a causa dell'assenza di segni clinici. Tuttavia, negli ultimi anni è stato riportato un numero crescente di focolai dovuti a *Betanodavirus* riassortante RNNV/SJNNV in diverse avannotterie di orata, motivo per cui si è deciso di eseguire delle prove sperimentali su giovanili e larve di orata per studiare la patogenesi della malattia, prestando particolare attenzione all'età dei pesci.

Sono stati eseguiti quattro studi sperimentali. Diversi lotti di orate di diversa età sono stati infettati con *Betanodavirus* riassortante RGNNV/SJNNV. Giovanili di orata (6-8 g) sono stati infettati per via intramuscolare con $10^{6.80}$ TCID₅₀/pesce. Larve di 75, 35 e 21 giorni dopo la schiusa (dph) sono state infettate per immersione con $10^{5.45}$ TCID₅₀/ml. I pesci sono stati monitorati per un periodo di 30 giorni dopo l'infezione (dpi) per osservare la comparsa di segni clinici e confermare qualsiasi caso di mortalità. Campioni di larve sono stati raccolti a differenti time-points: 24 h, 48h, 72h, 96h e a 5, 6, 7, 12, 13, 19, 21, 24, 30 giorni post infezione (dpi), per le successive analisi molecolari e di immunoistochimica.

I giovanili di orata infettati non hanno mostrato segni clinici né mortalità. Tuttavia, tutti i campioni di cervello raccolti alla fine dello studio sono risultati positivi per il betanodavirus. Allo stesso modo, le larve infettate a 75 e 35 dph non hanno mostrato segni clinici né mortalità, quindi abbiamo continuato a monitorarle per un periodo più lungo, e sono risultate positive nel cervello fino a un anno dopo l'infezione. Le larve infettate a 21 dph hanno invece mostrato segni clinici tipici della malattia a 9 dpi, con i soggetti affetti che mostravano apatia, nuoto anomalo e iperinsufflazione della vescica natatoria. La mortalità è iniziata a 10 dpi, ha raggiunto il picco a 11-13 dpi per poi diminuire senza mai cessare completamente. La mortalità cumulativa è stata elevata ma non è stato possibile quantificarla con precisione a causa dell'impossibilità di contare il numero esatto di larve all'inizio della prova. La RT-PCR quantitativa di RNA1 e RNA2 è attualmente in corso e mira a caratterizzare la cinetica della replicazione virale.

Concludendo, l'orata è suscettibile a RGNNV/SJNNV, sebbene lo sviluppo dei segni clinici sia dipendente dall'età degli animali. Ciò è probabilmente correlato allo stadio di sviluppo del sistema immunitario dei pesci. Una volta infettate, le larve rimangono persistentemente infette per un lungo periodo di tempo, diventando così un potenziale rischio come portatori asintomatici.

Questo studio è stato finanziato dal Ministero della Salute RC IZSVe 09/15

INFEZIONE DA BETANODAVIRUS (RGNNV/SJNNV) IN LARVE DI ORATA (*SPARUS AURATA*): UNO STUDIO IMMUNOISTOCHEMICO

Pretto T., Marsella A., Toffan A., Pascoli F.¹

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD).

Negli ultimi anni numerosi episodi di encefalopatia virale (VER) sono stati rilevati in avannotterie di orata (*Sparus aurata*) determinando elevate mortalità nelle fasi larvali.

Betanodavirus isolati da questi episodi sono stati caratterizzati come genotipo riassortante RGNNV/SJNNV. Date le limitate informazioni disponibili in letteratura sull'infezione in orata da VER riassortante, un'infezione sperimentale è stata eseguita per chiarirne la patogenesi mediante analisi istologiche ed immunoistochimiche (IHC).

La suscettibilità all'infezione e la progressione della patologia sono state indagate in larve di orata infettate a due età differenti: 21 giorni dalla schiusa (dph) e 35 dph. Per ciascun gruppo di età un lotto di circa 10,000 larve è stato distribuito in due vasche da 300 l: un gruppo di controllo ed uno infettato, entrambi mantenuti a 19.5°C e salinità 37 ‰.

L'infezione è stata eseguita per immersione con $10^{5.45}$ TCID₅₀/ml di RGNNV/SJNNV betanodavirus. Cinque larve sono state fissate in formalina tamponata 10% a differenti *time-point*: 24 h, 48h, 72h, 96h e a 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 24, 30 giorni post infezione (dpi).

I campioni sono stati processati e colorati in ematossilina-eosina mentre per l'IHC è stato impiegato un siero policlonale prodotto *in-house* contro SJNNV.

Gli esemplari infettati a 21 dph hanno evidenziato, a partire da 9 dpi, segni clinici come apatia, nuoto anomalo, iper-insufflazione della vescica natatoria; la mortalità è cominciata a 10 dpi, ha raggiunto il suo picco tra 11 e 13 dpi, riducendosi progressivamente fino alla fine della sperimentazione (30 dpi).

Gli esemplari infettati a 35 dph non hanno evidenziato segni nervosi e non è stata registrata alcuna mortalità.

L'analisi IHC ha evidenziato, negli esemplari di 21 dph, i primi immunoprecipitati a partire dalle 72 h post-infezione nell'encefalo e midollo spinale; nella retina a partire dalle 96 hpi. L'encefalo è risultato il primo organo ad evidenziare diffusa immunopositività già a 96 hpi, mentre la retina solo dopo il sesto giorno dpi. Fenomeni necrotici a carico della sostanza grigia encefalica (telencefalo, lobi ottici mesencefalici, diencefalo e cervelletto) e retina (strato nucleare interno e gangliare) sono stati osservati a partire da 9 dpi, contestualmente alla comparsa dei segni clinici, mentre chiare vacuolizzazioni sono comparse più tardivamente (12 dpi). Gli immunoprecipitati sono stati rilevati nel midollo spinale fino a 24 dpi, mentre in encefalo e nella retina fino a 30 dpi, associati a foci di vacuolizzazione.

Gli esemplari infettati a 35 dph hanno evidenziato i primi immunoprecipitati a 96 hpi in encefalo e a 5 dpi in retina, persistenti fino a 20 dpi nel midollo spinale e fino a 30 dpi in encefalo e soprattutto nella retina. Sono stati osservati fenomeni necrotici nella retina a partire da 10 dpi mentre vacuolizzazioni retiniche ed encefaliche sono comparse più tardivamente a 15 dpi fino ai 30 dpi.

Il presente studio ha permesso di valutare la progressione dell'infezione da betanodavirus riassortante evidenziando come l'apice della proliferazione virale (presenza di immunoprecipitati) sia antecedente all'evidenza di fenomeni necrotici e vacuolizzazioni nel tessuto nervoso. Lo studio ha inoltre evidenziato in orata una suscettibilità alla forma clinica della malattia variabile in ragione dell'età degli esemplari infettati.

Questo studio è stato finanziato dal Ministero della Salute RC IZSVE 09/15

STUDIO DI PATOGENICITÀ DI DIVERSI CEPPI DI RGNNV/SJNNV IN SPIGOLA (*DICENTRARCHUS LABRAX*): RISULTATI PRELIMINARI

Toffan A., Biasini L., Marsella A., Abbadi M., Toson M., Pretto T., Buratin A., Pascoli F.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Italia

L'infezione da betanodavirus riassortante RGNNV/SJNNV è considerata una patologia emergente per l'acquacoltura mediterranea, in particolar modo per le avannotterie di orata. Durante gli episodi in campo di malattia, sono state segnalate mortalità di lieve e/o moderata entità nelle spigole infettate con il virus riassortante. Lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare la patogenicità di diversi ceppi di virus riassortante RGNNV/SJNNV nei confronti della spigola.

Per lo studio, sono stati selezionati diversi ceppi di betanodavirus isolati nel corso degli anni passati (2005-2018) in focolai avvenuti in Europa. Esemplari di spigola del peso di circa 5-6 grammi sono stati immessi nelle vasche e mantenuti ad una temperatura dell'acqua di 25°C e 25‰ di salinità. Dopo un periodo di acclimatamento, i pesci sono stati infettati per via intramuscolare con 0,1 ml di soluzione virale con titoli compresi tra 10^4 e 10^5 TCID₅₀/ml ed osservati per 28 gg. Come controlli sono stati inoculati terreno di coltura sterile per il controllo negativo, il ceppo RGNNV 283/09, noto per la sua patogenicità in spigola, come controllo positivo, e due virus SJNNV come confronto. Dai soggetti sintomatici e da 10 sopravvissuti per vasca sono stati campionati gli encefali da sottoporre a RT-PCR qualitativa e quantitativa.

Tra i ceppi utilizzati, i virus SJNNV hanno confermato la loro scarsa patogenicità nei confronti della spigola. Il virus RGNNV ha invece causato il 34.5% di mortalità. I virus RGNNV/SJNNV hanno dimostrato in genere una patogenicità molto ridotta e paragonabile ai virus SJNNV. Solo due ceppi virali hanno evidenziato una patogenicità maggiore rispetto ai gli altri e solo uno statisticamente supportato.

Tutti i soggetti morti ed anche i soggetti sopravvissuti sono risultati positivi al virus di challenge. Sono in corso le analisi quantitative per caratterizzare la replicazione virale nei sopravvissuti e approfondimenti genetici per evidenziare eventuali determinanti di patogenicità.

Saranno effettuati ulteriori studi mediante infezione per bagno e/o a diverse condizioni ambientali con alcuni dei ceppi virali selezionati.

I risultati di questo studi, sebbene preliminari, indicano che la spigola è suscettibile al betanodavirus RGNNV/SJNNV. I diversi ceppi virali hanno evidenziato una diversa patogenicità, generalmente inferiore rispetto al genotipo RGNNV. La positività riscontrata nei cervelli di tutti i soggetti sopravvissuti, sebbene asintomatici, è comunque un risultato di rilievo che suggerisce un possibile ruolo di portatore della spigola ei confronti dell'orata con la quale contestualmente viene spesso allevata.

Lo studio è stato realizzato nell'ambito del progetto H2020 VetBioNet.

ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DI *CARNOBACTERIUM* SPP. IN SALMERINI DI FONTE CATTURATI IN LAGHI D'ALTA QUOTA

Pastorino P.^{1,2}, Colussi S.¹, Menconi V.¹, Levetti S.¹, Mugetti D.¹, Esposito G.³, Pizzul E.², Acutis P.L.¹, Prearo M.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; ²Dipartimento Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste, Trieste; ³Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari, Sassari

Fra le malattie che colpiscono i salmonidi vanno annoverate le infezioni sostenute da cocchi Gram positivi, patogeni a temperatura dell'acqua inferiore ai 15°C e note anche come “Streptococchi d'acqua fredda”. Storicamente si conosceva già una patologia ascrivibile a questo gruppo che colpiva in modo sporadico e con una mortalità molto ridotta soprattutto i riproduttori di salmonidi stabulati nelle zone pedemontane: la carnobatteriosi, sostenuta da *Carnobacterium piscicola* ora denominato *C. maltaromaticum*.

Il genere *Carnobacterium* comprende 9 specie, ma solo due di queste (*C. maltaromaticum* e *C. divergens*) sono relativamente frequenti in ambiente acquatico ed isolate soprattutto a livello della flora intestinale di pesci allevati in acque fredde. Negli ultimi decenni non sono stati segnalati ritrovamenti importanti, perdendo l'abitudine alla loro ricerca ed alla valutazione del possibile ruolo patogenetico. L'effetto patogeno sui pesci è stato ampiamente descritto, con presenza di quadro anatomopatologico tipico delle streptococchi con esoftalmo, accumulo di liquido ascitico in cavità addominale e presenza di emorragie nei diversi organi interni.

Lo scopo di questo lavoro è quello di segnalare l'isolamento di batteri appartenenti al genere *Carnobacterium* dall'umor vitreo dell'occhio di salmerini di fonte (*Salvelinus fontinalis*) catturati in due laghi di alta quota (Lago sottano e Lago soprano della Balma, Coazze, Torino) senza sintomatologia in atto. Il campionamento ittico è stato effettuato ad agosto 2018 mediante reti multimaglia branchiali pelagiche e bentiche. Tutti i soggetti catturati sono stati sottoposti ad esame necroscopico e batteriologico da rene, cervello e occhio (umor vitreo). In totale sono stati catturati 73 esemplari di salmerino di fonte nel lago sottano e 15 nel lago soprano. L'esame necroscopico non ha evidenziato alcuna alterazione patologica nelle due popolazioni. L'esame batteriologico, invece, è risultato positivo solo da occhio nel 31,5% dei salmerini catturati nel lago sottano (23) e nel 40,0% in quelli del lago soprano (6). Le specie batteriche isolate e identificate mediante MALDI-TOF-MS sono attribuibili a solo due specie: *C. maltaromaticum* e *C. divergens*.

L'identificazione è stata confermata mediante specifica PCR per il gene dell'RNA ribosomiale 16S e 23S e per il gene della batteriocina PisA. Gli ampliconi ottenuti per il gene dell'RNA ribosomiale sono stati successivamente sequenziati, al fine di identificare genere e specie di appartenenza degli isolati, utilizzando la banca dati online di BLAST.

L'isolamento di germi appartenenti al genere *Carnobacterium* porta ad ipotizzare come questi potenziali patogeni possano rimanere in una sorta di latenza in un organo (cosiddetto “effetto cavallo di Troia”) per poi eventualmente esplicare azione patogena durante episodi di stress che abbassino le difese immunitarie dei soggetti colpiti.

Questa possibilità dovrebbe essere maggiormente studiata al fine di implementare la conoscenza sulla patogenesi di questi batteri.

***YERSINIA RUCKERI* IN STORIONE SIBERIANO (*ACIPENSER BAERI*): DESCRIZIONE DI UN EPISODIO IN UN ALLEVATO NEL NORD ITALIA**

Salogni C.¹, Accini A.², Alborali G.L.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia. ²Hendrix spa. Skretting. Mozzecane, Verona.

Nel presente lavoro viene descritto un focolaio d'infezione da *Yersinia ruckeri* in storioni siberiani (*Acipenser baeri*) che ha interessato una partita di circa 5.000 pesci del peso medio di 150 g, verificatosi nel mese di luglio del 2019, in una piscicoltura del Nord Italia. L'episodio è stato caratterizzato da una mortalità giornaliera compresa tra lo 0,5 e 1% e si è protratta per circa quindici giorni, per poi diminuire progressivamente fino a cessare in circa 30 gironi e raggiungendo un valore cumulativo del 10%. Nell'allevamento non erano presenti altre specie ittiche e la partita di pesci era stata introdotta circa un mese prima della comparsa dell'episodio.

La sintomatologia era caratterizzata da apatia, inappetenza, esoftalmo bilaterale di modica entità, melanosi cutanea, emorragie cutanee, alla base delle pinne e nella regione perineale ed erosioni disseminate su tutto il corpo. Tutti i pesci pervenuti in laboratorio sono stati sottoposti a esame anatomopatologico, esami standard parassitologici microscopici a fresco, colturali e virologici.

L'esame autoptico ha evidenziato congestione epatica, lieve aumento di volume della milza, distensione della vescica natatoria per accumulo di gas ed enterite catarral-emorragica.

L'esame colturale, eseguito su agar sangue e TSA, ha permesso l'isolamento di colonie in purezza da tutti i visceri in tutti i soggetti analizzati (forma setticemica). Le colonie sospette erano caratterizzate da colorazione biancastra e da diametro massimo, dopo 48-72 h d'incubazione, di 3-4 millimetri, con aspetto liscio, piatto, rotondo e con margini netti e senza emolisi. La colorazione di Gram ha evidenziato dei piccoli bacilli Gram negativi.

Gli esami parassitologici (a fresco su impronta e striscio d'organo: cute, branchie ed intestino), e microscopici per ricerca di flavobatteri hanno dato esito negativo.

La tipizzazione del germe isolato come *Yersinia ruckeri* è stata eseguita tramite caratterizzazione biochimica (macrometodo, sistema miniaturizzato API20E), genomica e sierologica.

La caratterizzazione biochimica ha consentito l'identificazione del microrganismo isolato come mobile e idrolizzante il tween 80. L'indagine genetica, tramite il sequenziamento del 16sRNA, ha confermato un'omologia genetica del 100% (database Microseq, gene bank BLAST) con *Yersinia ruckeri*. L'esame sierologico, che ha previsto l'utilizzo di un siero policlonale coniugato al lattice (Bionor Mono Yr) in test di agglutinazione rapida, con esito positivo.

Il trattamento terapeutico intrapreso con mangime antibiotato con ossitettraciclina, sulla base della sensibilità saggiata con metodica Kirby-Bauer, ha determinato la forte riduzione della mortalità e la scomparsa della sintomatologia.

Il presente lavoro rappresenta la seconda segnalazione sul territorio nazionale, e una delle poche a livello mondiale, dell'infezione di *Yersinia ruckeri* nello storione siberiano, a distanza di dieci anni dalla precedente effettuata sempre nel Nord Italia. Il quadro clinico e anatomopatologico, pur presentando alcune similitudini col caso precedentemente descritto, se ne differenzia sotto diversi punti di vista tra cui la taglia degli animali colpiti e l'entità della mortalità. Il ceppo identificato, pur avendo analogie biochimiche con quello precedentemente isolato è da ascrivere al biotipo 1.

MYCOBACTERIUM PSEUDOSHOTTSSII: AGGIORNAMENTO DEI NUOVI CASI IN ITALIA E ANALISI ISTOLOGICA IN OMBRINA OCELLATA (*SCIAENOPS OCELLATUS*)

Mugetti D., Varello K., Arillo A., Menconi V., Pastorino P., Levetti S., Cappelleri A., Dondo A., Bozzetta E., Prearo M.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino.

Mycobacterium marinum è tra le più note specie di microrganismi implicati nell'insorgenza di micobatteriosi ittiche, un complesso di patologie a carattere infettivo cronico sostenute da micobatteri non tubercolari che colpiscono gli organismi acquatici. L'utilizzo di tecniche biomolecolari nello studio e nella diagnosi di queste malattie ha permesso di riconoscere un elevato numero di nuovi agenti eziologici, precedentemente identificati non correttamente come *M. marinum* per mezzo di prove biochimiche. Tra esse, *M. pseudoshottsii* è una specie ufficialmente classificata dal 2005, responsabile di un episodio epizootico di micobatteriosi nel persico spigola (*Morone saxatilis*) nella baia di Chesapeake (Maryland, USA). Altri casi di infezione da *M. pseudoshottsii* sono stati successivamente descritti in Nord America e in Giappone. La prima segnalazione europea risale al 2018, quando viene descritto un caso di micobatteriosi ittica sostenuta da tale microrganismo a carico di esemplari di branzino (*Dicentrarchus labrax*) allevati in Sud Italia. Il presente lavoro ha lo scopo di riportare nuovi casi di micobatteriosi sostenuti da *M. pseudoshottsii* in Italia nel biennio 2018-2019, soffermandosi in particolar modo su un episodio con sintomatologia conclamata che ha coinvolto esemplari di ombrina ocellata (*Sciaenops ocellatus*), sui quali sono state condotte analisi istologiche e colturali.

Il monitoraggio svolto ha coinvolto quattro impianti produttivi italiani, di cui due localizzati nel medio Tirreno e i restanti nel basso Adriatico. Sono stati analizzati 107 pesci di diverse specie così suddivisi: 63 branzini, 34 ombrine ocellate, 10 orate (*Sparus aurata*). Esami anatomopatologici e colturali sono stati svolti su ogni soggetto analizzato. L'esame colturale è stato svolto a partire da diversi organi (milza, fegato, rene, cute) che, previa omogeneizzazione e decontaminazione, sono stati seminati su terreni solidi selettivi per micobatteri (Löwenstein-Jensen e Stonebrink medium) incubati a $28\pm 1^\circ\text{C}$ e $37\pm 1^\circ\text{C}$ per 60 giorni. Le colonie cresciute sono state saggiate con la colorazione di Ziehl-Neelsen (ZN) e, quando positive, identificate per mezzo di amplificazione e sequenziamento di porzioni di geni *housekeeping* (*16S rRNA*, *hsp65*, *rpoB*). In 8 ombrine con sintomatologia conclamata, sono stati prelevati in sede necroscopica porzioni di diversi organi (branchia, milza, fegato e rene) per l'esame istopatologico. Gli organi sono stati fissati in formalina tamponata al 10%, inclusi in paraffina, tagliati in sezioni di $4 \pm 2 \mu$ e colorati con Ematossilina-Eosina (EE) e colorazione istochimica di ZN per l'identificazione di bacilli alcool-acido resistenti.

L'esame anatomopatologico ha permesso di evidenziare granulomi miliari a carico degli organi parenchimatosi (fegato, milza) in diversi soggetti presi in esame. Le lesioni hanno interessato massivamente anche il tessuto renale, motivo per cui si è scelto di procedere con l'esame istopatologico. All'esame istologico è stato possibile rilevare lesioni in tutti gli organi analizzati, con particolare gravità a livello splenico e renale, in cui si è potuta osservare la presenza di granulomi multipli necrotizzanti con tendenza a confluire fino a alterare quasi completamente la normale architettura dell'organo con diffusa presenza di bacilli alcool-acido resistenti. Branchie e fegato presentavano anch'essi granulomi multipli necrotici e massiva presenza di batteri ZN positivi. L'esame colturale ha evidenziato positività in 29 soggetti (19 spigole, 9 ombrine ocellate, 1 orata) e l'identificazione di specie ha permesso di classificare gli isolati come *M. pseudoshottsii*. Le micobatteriosi ittiche sostenute da *M. pseudoshottsii* appaiono una problematica emergente negli impianti di pesci marini del Mediterraneo. Questo lavoro ha permesso di ampliare lo spettro d'ospite precedentemente noto di specie colpite da tale micobatterio. Ulteriori dati epidemiologici risultano necessari per capire se i casi descritti possano essere considerati unicamente episodi isolati o se tale malattia infettiva potrà assumere connotati più gravi per gli allevamenti mediterranei.

ANTIBIOTICO RESISTENZA IN CEPPI DI *AEROMONAS* SPP. ISOLATI IN PESCE ROSSO (*CARASSIUS AURATUS*)

Leveti S.¹, Barbero R.¹, Mugetti D.¹, Menconi V.¹, De Vita V.², Pastorino P.¹, Arsieni P.¹, Dondo A.¹, Prearo M.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; ²La Casetta in Canada, Settimo Torinese (TO).

L'Italia importa pesci ornamentali sia da Paesi Terzi che da Paesi Comunitari, per un valore di circa 8 milioni di euro, dei quali quasi il 90% è rappresentato da esemplari d'acqua dolce, i più commercializzati sul territorio nazionale. La maggior parte dei campioni analizzati in questo studio provengono dall'Italia e da Paesi extra Europei come Thailandia, Israele e Singapore, in cui i controlli sanitari non sono sempre così stringenti come quelli della Comunità Europea, come neppure le norme sul corretto uso del farmaco. La finalità di questo lavoro è quella di valutare l'antibiotico resistenza in ceppi di *Aeromonas* spp. isolati da 30 esemplari di *Carassius auratus*. Tutti i soggetti analizzati sono giunti in laboratorio vivi, contenuti in appositi sacchetti con acqua adeguatamente condizionata e successivamente soppressi mediante anestesia profonda con MS-222. Sono stati sottoposti a necropsopia, valutando l'eventuale presenza di alterazioni patologiche. È stato eseguito l'esame colturale da rene e cervello. L'inoculo è stato seminato direttamente su Tryptic Soy Agar (TSA) e su Agar Sangue (AS). Le colonie, eventualmente cresciute dopo 24-72 ore di incubazione a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, sono state clonate e identificate mediante prove fenotipiche e biochimiche (sistema API 20E e 20NE, bioMérieux) e successiva conferma al MALDI-TOF. Sono stati allestiti gli antibiogrammi per la valutazione della sensibilità dei batteri isolati agli antibiotici specifici, utilizzando un panel di 16 molecole in uso presso il laboratorio Specialistico di Ittiopatologia di Torino. A tal fine, è stata utilizzata la tecnica di Kirby-Bauer, tramite infusione su terreno Müller-Hinton (MH) con un inoculo a torbidità dello 0,5 McFarland. Dopo 24 ore di incubazione a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, i ceppi sono stati classificati come sensibili (S), intermedi (I) e resistenti (R), in base all'alone di inibizione, valutato seguendo le linee guida del CLSI, in relazione ai *breakpoints* definiti. L'esame colturale è risultato positivo in 22 soggetti (73,3%), di cui 3 identificati come germi ambientali non significativi, 10 come *A. hydrophila* e 9 come *A. sobria* (confermati al MALDI-TOF). Per quanto riguarda la sensibilità agli antibiotici, si è osservata una resistenza degli isolati nei confronti di amoxicillina, mentre una sensibilità è stata osservata nei confronti di florfenicolo. La sensibilità/resistenza dei ceppi nei confronti di flumequina, di sulfamidico potenziato e di oxitetraciclina variavano caso per caso. Il passo successivo è stato quello di testare la Minima Concentrazione Inibente (MIC) della cefuroxima (cefalosporina di seconda generazione) e della levofloxacina (chinolone di terza generazione) con la tecnica dell'E-test sul terreno MH; l'utilizzo di tali molecole è indicativo per vedere se le resistenze ottenute nei confronti dei composti β -lattamici e dei chinoloni erano reali anche su molecole di ultima generazione. *A. sobria* è risultato sensibile nei confronti della cefuroxima, mentre *A. hydrophila* resistente; entrambe le specie batteriche sono risultate sensibili alla levofloxacina. Tra i germi ubiquitari dell'ambiente acquatico, senza alcun dubbio i batteri appartenenti al gruppo degli *Aeromonas* mobili sono i maggiori artefici del fenomeno di antibiotico-resistenza, problematica estremamente attuale e di difficile risoluzione. Infatti, il genere *Aeromonas* produce B-lattamasi per le classi B metallo-beta-lattamasi, C per cefalosporine e D per penicilline; inoltre, *A. hydrophila* porta con sé un plasmide stabile che gioca un ruolo importante nella resistenza microbica e nella virulenza. L'antibiotico resistenza è estremamente comune nei batteri isolati da animali acquatici, a causa soprattutto dell'uso indiscriminato degli antibiotici sia negli allevamenti, che nelle acque di trasporto. La perdita di efficacia dell'azione terapeutica, rappresenta un problema di salute pubblica, con gravi conseguenze per la sanità animale. Questo studio, seppur preliminare, anticipa ciò che si intende svolgere sulla valutazione dell'insorgenza di nuove resistenze, al fine di analizzare tramite le tecniche di PCR le resistenze acquisite sul sito genetico di interesse ed approfondire la tematica delle acque di trasporto, come veicolo di germi resistenti.

MIC (MINIMAL INHIBITORY CONCENTRATION) NEI CONFRONTI DEI PRINCIPALI BATTERI PATOGENI DEI PESCI: VALUTAZIONE DEGLI EPIDEMIOLOGICAL CUT-OFF

Manfrin A.¹, Fiocchi E.¹, Cocchi M.¹, Deotto S.¹, Michieletti G.¹, Toson M.¹, Zambon M.¹, Boscarato M.¹, Pretto T.¹

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD).

Il corretto utilizzo dei farmaci veterinari nelle specie acquatiche allevate è uno degli argomenti più attuali e di interesse per gli operatori in acquacoltura. Rappresenta anche un aspetto prioritario per la sostenibilità delle produzioni, per la sicurezza del consumatore, per la salute e il benessere animale delle specie in allevamento e per l'ambiente. Di conseguenza, anche nel settore dell'acquacoltura è emersa la necessità di definire delle corrette prassi per l'utilizzo dei medicinali veterinari che prevedano: una corretta diagnosi eziologica dell'agente patogeno responsabile di malattia, l'esecuzione di un test di sensibilità in vitro nei confronti delle principali molecole disponibili sul mercato per la produzione di mangimi medicati, delle modalità di somministrazione (dosaggi, tempistiche, rispetto dei tempi di sospensione, *etc.*) corrette e specifiche per ciascuna specie ittica allevata. Mentre quest'ultimo punto compete esclusivamente al veterinario che segue gli aspetti sanitari dell'impianto, in qualità di laboratori dobbiamo intervenire in modo significativo nelle fasi precedenti. Grazie ad anni di training e alla partecipazione, sempre con esito favorevole, a numerosi Proficiency Test sull'identificazione dei batteri patogeni per gli organismi acquatici, la corretta diagnosi eziologica è ormai un fatto consolidato. Per quanto riguarda invece i test di sensibilità in vitro agli antibiotici, la tecnica di diffusione in agar (Kirby Bauer) comincia ad essere insufficiente a suggerire un "prudent use" di tali molecole in ambiente acquatico, per cui risulta ancora necessario uno studio più approfondito in previsione dell'utilizzo routinario delle M.I.C. (Minimal Inhibitory Concentration) per testare la sensibilità dei patogeni batterici anche nel settore dell'acquacoltura. Seguendo le indicazioni previste dal documento CLSI VET 04 - A2 (Methods for broth dilution susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals. Approved guideline – second edition, 2014) al fine di standardizzare le tecniche di diluizione, inoculo delle piastre e lettura, utilizzo dei controlli, sono stati testati alcuni dei principali patogeni per le specie ittiche allevate in Italia: 60 ceppi di *Aeromonas* spp., 22 ceppi di *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, 24 ceppi di *Flavobacterium psychrophilum*, 53 ceppi di *Lactococcus garvieae*, 50 ceppi di *Yersinia ruckeri*, 30 ceppi di *Vibrio harveyi*. I risultati, elaborati statisticamente in collaborazione con il Laboratorio di epidemiologia applicata agli organismi acquatici, hanno consentito di determinare le MIC₅₀ e la MIC₉₀ ma, in assenza di specifici clinical break points, siamo ancora lontani dal fornire un dato attendibile per i colleghi veterinari che dovessero prescrivere un mangime medicato da utilizzarsi in caso di focolaio di malattia batterica. Nei prossimi mesi sarà necessario creare un network di laboratori (almeno 5-6) che testino un centinaio di ceppi per singola specie batterica nei confronti delle principali molecole antimicrobiche utilizzabili in acquacoltura e che si confrontino tra di loro con Proficiency Test nazionali o internazionali, allo scopo di individuare quantomeno gli epidemiological cut-off utili a discriminare quando un ceppo batterico risulta essere sensibile o resistente a quello specifico antibiotico.

PRODOTTI NATURALI MARINI (MNPs) COME NUOVE SOSTANZE AD AZIONE ANTIBATTERICA DA UTILIZZARE NELL'ALLEVAMENTO DI BRANZINO (*DICENTRARCHUS LABRAX*) E ORATA (*SPARUS AURATA*)

Bulfon C.¹, Pacorig V.¹, Zamperoni D.¹, D'Ippolito G.², Nuzzo G.², Volpatti D.¹, Fiocchi E.³, Pretto T.³, Manfrin A.³, Fontana A.², Galeotti M.¹

¹Sezione di Scienze Animali e Veterinarie, Dipartimento di Scienze Agroalimentari, Ambientali e Animali (DI4A), Università degli Studi di Udine, Udine (UD), Italy; ²Istituto di Chimica Biomolecolare (ICB), CNR, Pozzuoli (NA); ³Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVE), Legnaro (PD)

Lo sviluppo di antibiotico-resistenza, dovuto all'uso indiscriminato di farmaci commerciali nel trattamento delle malattie batteriche, rappresenta un serio problema per l'acquacoltura mediterranea. Per tale motivo, da alcuni anni le ricerche si stanno focalizzando sul possibile impiego di sostanze alternative di origine naturale da impiegare negli allevamenti ittici per controllare la diffusione delle infezioni. L'obiettivo della presente indagine è stato studiare l'attività antibatterica *in vitro* di alcuni prodotti naturali marini (MNPs) nei confronti dei principali patogeni che colpiscono il branzino (*Dicentrarchus labrax*) e l'orata (*Sparus aurata*).

I ceppi batterici utilizzati (*Vibrio anguillarum* sierotipo O1, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* e *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*) sono stati isolati (Università di Udine e IZSVE) durante focolai spontanei di malattia. Gli MNPs testati sono stati prodotti dal CNR, sia come estratti grezzi sia come frazioni arricchite mediante estrazione in fase solida (SPE), che consente un elevato recupero e separazione dei metaboliti primari e secondari dai peptidi all'olio (Cutignano *et al.*, 2015). Il potenziale antimicrobico degli MNPs è stato valutato mediante determinazione delle concentrazioni minime inibente e battericida (MIC e MBC), con metodo delle microdiluizione in brodo (Bulfon *et al.*, 2014). Sono state riscontrate differenze evidenti nell'attività antibatterica dei composti, a seconda dell'organismo marino utilizzato per l'estrazione degli MNPs e della specie batterica *target*. Gli estratti/frazioni purificati dagli invertebrati *Gastropteron meckeli* e *Crambe crambe* hanno mostrato un ampio spettro di effetti inibitori contro i ceppi batterici testati. I valori di MIC e MBC dei prodotti ottenuti da *G. meckeli* sono risultati compresi tra 2,1 e 8,3 µg/ml e tra 4,2 e 16,7 µg/ml, rispettivamente. I valori di MIC e MBC dei prodotti ottenuti da *C. crambe* sono risultati compresi tra 4,2 e 33,4 µg/ml e tra 8,3 e 66,7 µg/ml, rispettivamente. Gli MNPs purificati da questi due organismi marini hanno rivelato un'azione battericida contro tutti i patogeni testati (MBC/MIC ≤4) ma sono risultati più efficaci nell'inibire la crescita dei ceppi di *P. damsela* rispetto a quella dei ceppi di *V. anguillarum*. Diversamente, estratti e frazioni purificate da altri organismi marini (diverse specie di spugne, microalghe, molluschi e tunicati) hanno mostrato effetti antibatterici trascurabili.

Ad oggi, le ricerche riguardanti il possibile impiego di MNPs in acquacoltura sono ancora limitate e le evidenze di questo studio sembrano essere promettenti per l'identificazione di nuove sostanze naturali da utilizzare per la terapia delle malattie batteriche nei pesci allevati.

Bulfon C., Volpatti D. & Galeotti M. (2014). *In vitro* antibacterial activity of plant ethanolic extracts against fish pathogens. J. World Aquac. Soc., 45: 545-557.

Cutignano A., Nuzzo G., Ianora A., Luongo E., Romano G., Gallo C., Sansone C., Aprea S., Mancini F., D'Oro U. & Fontana A. (2015). Development and application of a novel SPE-method for bioassay-guided fractionation of marine extracts. Mar. Drugs, 13: 5736-5749.

Ricerca finanziata da AdriAquaNet project (application ID 10045161), 2014-2020 Interreg V-A Italy-Croatia CBC Programme, Priority Axis: Blue innovation.

TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF *AMYLOODINIUM OCELLATUM* TOMONTS REVEALED BASIC INFORMATION ON THE MAJOR POTENTIAL VIRULENT FACTORS

Byadgi O.¹, Marroni F.^{2,3}, Dirks R.⁴, Massimo M.¹, Volpatti D.¹, Galeotti M.¹, Beraldo P.¹

¹Section of Animal and Veterinary Sciences, Department of Agricultural, Food, Environmental and Animal Sciences (DI4A), University of Udine, 33100 Udine, Italy; ² Department of Agricultural, Food, Environmental and Animal Sciences, University of Udine, Via delle Scienze 206, 33100, Udine, Italy; ³ IGA Technology Services, Via Jacopo Linussio, 51, 33100, Udine, Italy; ⁴ Future Genomics Technologies B.V, Leiden, the Netherlands.

The ectoparasite protozoan *Amyloodinium ocellatum* (AO) is the causative agent of amyloodiniosis in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) (ESB). There is a lack of information about basic molecular data on AO biology and interaction with the host. The paucity of molecular data has hindered the progression of our understanding of the mechanisms contributing to the parasite virulence. Furthermore, the lack of a whole-genome sequence of AO considerably limits any comparative ‘omics’ analysis (Transcriptome, Proteome). Therefore, a *de-novo* transcriptome sequencing of AO tomites was performed. Dinospores are routinely used in our laboratory for experimental challenges in ESB. A method has been standardized to detach the AO trophonts from ESB gills, early tomites were purified by Percoll® density gradient, and subsequently centrifuged to pellet them. Tomont total RNA extractions were processed immediately using Qiagen based column kit. Total RNA from tomites was shipped using dry ice to Future genomics, The Netherlands. cDNA libraries were made using the following kit, TruSeq® Stranded mRNA LT and sequenced using Illumina sequencing. CLC assembly was used to generate the Transcriptome assembly of AO tomites and to create the reference. Results indicated that, out of 48, 188 contigs, 93.4% belong to Eukaryota and 56.12% to dinophyceae. The majority of the contigs from dinophyceae had a similarity with *Symbiodinium microadriaticum* (94.61%). Functional annotations of contigs indicated that 13,667 transcripts had a blastx hit against Uniprot; 12,677 had at least an associated GO term, 9005 had at least an associated KEGG term, and 2,953 had an associated eggNOG term. The contigs belonging to dinophyceae resulted in the detection of several peptidases with contigs of AO excluding hits to non-peptidase homologues and inhibitors. All the AO contigs were subjected to BLAST search for known virulent factors from virulence database MvirDB. Hits matching to Rab proteins, Rab11B, RabA, Rab 7A, Plasmepsin IV, Brucipain, and Hsp70 were the most abundant virulent factors. Therefore, all these major proteins identified can be considered as potential virulence factors in AO. Altogether, these results provide an important contribution towards understanding the AO molecular biology, implementing the biological knowledge on its virulence/antigenicity and allowing to develop targeted preventive measures.

The study was conducted within the framework of ParaFishControl, a EU H2020-funded project (634429) aimed at increasing sustainability and competitiveness of the aquaculture industry by controlling and mitigating parasitic species affecting the main European farmed fish species.

ASPETTI IMMUNOLOGICI RELATIVI ALLA PROTEZIONE DEL BRANZINO (*D. LABRAX*) CONTRO *AMYLOODINIUM OCELLATUM* MEDIANTE VACCINAZIONE INTRACELOMATICA

Volpatti D., Massimo M., Bulfon C., Byadgi O., Galeotti M. e Beraldo P.

Sezione di Scienze Animali e Veterinarie, Dipartimento di Scienze Agroalimentari, Ambientali e Animali, Università degli Studi di Udine, Udine.

Nell'ambito del progetto ParaFishControl (EU H2020) sono stati previsti approfondimenti sull'interazione tra l'ectoparassita *Amyloodinium ocellatum* (protozoo dinoflagellato) e il branzino (*Dicentrarchus labrax*), indagando sui principali meccanismi di difesa dell'ospite, affinché in futuro, mediante un presidio vaccinale, possa essere limitato l'impatto della amyloodiniosi in determinati contesti di allevamento, come la vallicoltura. Ad oggi non esistono formulazioni sperimentali e commerciali utili a prevenire l'amyloodiniosi e sono state segnalate solo poche esperienze di vaccinazione in specie ittiche diverse dal branzino.

Presso il nostro laboratorio (DI4A, Università di Udine), negli ultimi anni sono stati messi a punto protocolli per: purificare il parassita da soggetti infetti; mantenere lo stesso in condizioni vitali per tempi prolungati; utilizzare il parassita per produrre (previa inattivazione) un vaccino; utilizzare il parassita vitale per riprodurre un modello di infezione. Sfruttando questo background conoscitivo è stato preparato un vaccino, costituito da dinospore inattivate con formaldeide e frammentate mediante potter, quindi esso è stato somministrato per via intracelomatica ($0,5 \times 10^6$ dinospore/200 μ l/soggetto), tal quale (N=40) o in combinazione con adiuvante Montanide™ ISA763 (N=40), a soggetti giovanili di branzino. Quali soggetti di controllo sono stati utilizzati due gruppi trattati per via intracelomatica con Montanide™ ISA763 (N=40) e con PBS (N=40). Dopo 1 e 6 mesi dall'immunizzazione, i 4 gruppi di pesci sono stati sottoposti a *challenge* con il parassita (*potency test* tramite immersione in acqua contenente 10 dinospore vitali/ml). L'esito della vaccinazione è stato monitorato in termini di risposta immunitaria e di copertura (percentuale relativa di sopravvivenza, RPS). La risposta post-vaccinale è stata valutata titolando gli anticorpi specifici anti *A. ocellatum* nel siero mediante E.L.I.S.A. indiretto, a 3 settimane e a 6 mesi dal trattamento. Inoltre, ai medesimi tempi, campioni di organi dotati di rilevanza dal punto di vista della risposta mucosale/sistemica (branchie, rene anteriore, grasso periviscerale) sono stati fissati in Bouin e processati per istologia e immunoistochimica (IHC). Anticorpi specifici per marcatori associabili alla risposta difensiva/infiammatoria da parte dell'ospite hanno consentito di descrivere la reazione dei tessuti ai diversi trattamenti di vaccinazione. Pur non riscontrando un aumento significativo del titolo anticorpale specifico contro il parassita sia a 3 settimane sia a 6 mesi dalla vaccinazione, è stato possibile registrare una protezione dal *challenge* pari al 100% nei soggetti trattati con vaccino più adiuvante, ad un mese dalla vaccinazione. Diversamente, la medesima formulazione non ha garantito un'efficace protezione dei branzini vaccinati a 6 mesi dal trattamento. Verranno proposte e discusse alcune ipotesi sull'attività del vaccino, in termini di meccanismo e durata dell'effetto immunomodulante.

Questo studio è stato finanziato e condotto grazie al progetto ParaFishControl (EU H2020-funded project, reference number 634429) finalizzato ad aumentare la sostenibilità e competitività dell'attività di acquacoltura mediante il controllo dei parassiti che colpiscono le principali specie ittiche allevate in Europa.

UN APPROCCIO MULTIMODALE MIRATO ALL'APPROFONDIMENTO DELLE INTERAZIONI OSPITE-PARASSITA IN BRANZINO INFETTATO DA *AMYLOODINIUM OCELLATUM*

Massimo M.¹, Volpatti D.¹, Calligaro C.¹, Byadgi O.¹, Galeotti M.¹, Ireland J.H.², Bron J.E.² and Beraldo P.¹

¹Dipartimento di Scienze Agroalimentari, Ambientali e Animali (DIAA), Università degli Studi di Udine, Udine (UD), Italy;

²Institute of Aquaculture, University of Stirling, Stirling, Scotland, UK

Amyloodinium ocellatum (AO) (Brown, 1931) è un protozoo ectoparassita, appartenente al phylum Dinoflagellata, caratterizzato da una distribuzione cosmopolita e da una scarsa specie-specificità. Nell'area del Mediterraneo, l'amyloodiniosi può rappresentare un serio problema per specie ittiche di importanza zootecnica, quali l'orata (*Sparus aurata*) e il branzino (*Dicentrarchus labrax*), soprattutto quando allevati in vallicoltura o in bacini in terra, dove, specialmente nei mesi estivi, la mortalità può raggiungere il 100%. La diagnosi precoce e la tempestività dell'intervento terapeutico (il solfato di rame è il trattamento di elezione grazie anche alla sua economicità, ma sebbene efficace come dinosporicida, non è registrato come farmaco) rappresentano le principali misure di controllo della amyloodiniosi. AO è uno dei parassiti target del progetto Horizon2020 ParaFishControl, il cui obiettivo generale è di aumentare la sostenibilità e la competitività dell'industria acquaculturale europea, tramite un approccio interdisciplinare per incrementare la comprensione delle interazioni pesce/parassiti al fine di sviluppare soluzioni e strumenti innovativi per la profilassi, prevenzione e controllo delle principali parassitosi dei pesci allevati. Pertanto, in accordo con gli obiettivi del progetto, è stato condotto uno studio multi modale mirato all'approfondimento della conoscenza sulla biologia di AO attraverso l'esplorazione del rapporto ospite-parassita. Per raggiungere questo scopo, sono state adottate diverse metodiche d'indagine: istologia (HIS), immunoistochimica (IHC), mRNA ibridazione *in situ* a fluorescenza (FISH) e microscopia confocale (CLSM).

Questo approccio investigativo ha consentito di ottenere nuovi dettagli sulle alterazioni tissutali nell'ospite (HIS) e sulla morfologia e struttura dei trofonti (CLSM) in adesione all'epitelio branchiale di branzini. Inoltre, la marcatura e la localizzazione sia delle popolazioni cellulari dell'ospite, reclutate per combattere il parassita, che le molecole sintetizzate dalle stesse come risposta immunitaria contro AO (IHC e FISH) sono in corso d'opera.

L'integrazione di queste nuove acquisizioni sulla relazione ospite/parassita (AO/branzino), con le attuali conoscenze su *Amyloodinium ocellatum*, è essenziale affinché siano definite misure preventive e di controllo dell'amyloodiniosi efficaci e sostenibili per l'ambiente.

This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 Aquaexcel research and innovation programme under grant agreement No 652831. This output reflects the views only of the author(s), and the European Union cannot be held responsible for any use, which may be made of the information contained therein. The study was conducted within the framework of ParaFishControl, a EU H2020-funded project (634429) aimed at increasing sustainability and competitiveness of the aquaculture industry by controlling and mitigating parasitic species affecting the main European farmed fish species.

AGGIORNAMENTI SULLA CRYPTOSPORIDIOSI NEI PESCI D'ALLEVAMENTO

Mazzone A., Caffara M., Fioravanti M.L.

Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Ozzano Dell'Emilia (BO)

I parassiti appartenenti al genere *Cryptosporidium* (Apicomplexa) sono protozoi in grado di infettare un vasto range di ospiti vertebrati che comprende uccelli, rettili, pesci e mammiferi, uomo compreso. Si ritiene che questo parassita sia ubiquitariamente diffuso nelle acque di superficie, sia in ambienti marini sia dulciacquicoli e la sua presenza è stata rilevata anche in diversi organismi acquatici in tutto il mondo, comprese molte specie di pesci selvatici e di molluschi bivalvi. Stando a studi precedentemente condotti, la prevalenza del protozoo nei pesci risulta in generale estremamente variabile. I dati disponibili riportano percentuali di positività in pesci d'acqua dolce pescati in fiumi e laghi di tutto il pianeta che spaziano da 0.5% a 37%. Sebbene l'interesse intorno alla presenza di questo protozoo in ambiente acquatico sia cresciuto consistentemente negli ultimi anni, sia per il loro possibile ruolo patogeno negli animali acquatici sia alla luce del potenziale zoonosico di alcune specie e genotipi, ancora pochi sono i dati disponibili circa la sua epidemiologia nei sistemi di allevamento marini e dulciacquicoli. In tabella sono riportate le specie di *Cryptosporidium* spp. segnalate in specie ittiche allevate a scopo alimentare.

	SPECIE	OSPITE	LUOGO
PESCI ALLEVATI A SCOPO ALIMENTARE	<i>C. molnari</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Spagna
		<i>Sparus aurata</i>	Spagna, Italia, Croazia
	<i>C. scophthalmus</i>	<i>Scophthalmus maximus</i>	Spagna
		<i>Psetta maxima</i>	Spagna
	<i>Cryptosporidium</i> spp. (genotipo ittico 9)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Spagna
	<i>Cryptosporidium</i> spp. (geneticamente correlato a <i>C. parvum</i>)	<i>Lates calcarifer</i>	Vietnam
	<i>C. parvum</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Spagna

Secondo quanto finora riportato, la maggiore densità di popolazione potenzialmente recettiva nei sistemi di allevamento facilita la diffusione dell'infezione: i tassi di prevalenza stimati in questi contesti sono molto più elevati, arrivando anche al 100%, così come riportato in giovanili di rombo parassitati da *C. scophthalmi*. Per quanto riguarda invece *C. molnari*, le prevalenze riportate nelle orate e nelle spigole spagnole variano molto secondo la fase di allevamento, toccando rispettivamente il 40% e il 95% nelle avannotterie esaminate. Questi dati sono conformi a quanto osservato dal nostro gruppo di ricerca nei settori di pre-ingrasso e ingrasso di alcuni allevamenti di orata distribuiti sul territorio italiano e croato. Nonostante resti da approfondire il reale ruolo patogeno del parassita, in alcune delle specie ittiche affette da cryptosporidiosi la presenza di elevate cariche infettanti di *Cryptosporidium* è stata associata alla comparsa di quadri clinici caratterizzati da distensione addominale, feci biancastre ed ascite. Stando agli studi condotti in Spagna su trote fario selvatiche e trote iridee allevate, è interessante e preoccupante al tempo stesso l'ipotesi che i pesci possano essere ospiti di specie e genotipi zoonosici e costituire una potenziale fonte d'infezione per l'uomo, specialmente per quelle categorie di lavoratori che, avendo quotidiano contatto diretto con gli animali, risultano maggiormente esposte al rischio di contrarre l'infezione. Scopo del presente lavoro è fornire una revisione critica di tutta la letteratura prodotta circa le parassitosi sostenute da *Cryptosporidium* spp. nei pesci allevati ed evidenziare i potenziali rischi per le produzioni zootecniche e per gli operatori del settore derivanti dalla presenza del parassita in acquacoltura.

EFFETTO ANTIPARASSITARIO DI ESTRATTI DI *JUGLANS REGIA* E *CESTRUM PARQUI* SU *SPARICOTYLE CHRYSOPHRII*: DATI PRELIMINARI

Scaturro G.¹, Romanelli A.², Carella F.², Zarrelli A.³, De Vico G.²

¹Piscicoltura del Golfo di Gaeta Soc. Agricola a R.L., Lungomare Caboto, 55 – 04024 Gaeta (Latina); ²Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli. ³Dipartimento di Scienze Chimiche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli.

Sparicotyle chrysophrii è un ectoparassita branchiale ematofago responsabile di episodi di mortalità in orate (*Sparus aurata*) in allevamento. L'effetto antiparassitario di estratti di *Juglans regia* e *Cestrum parqui* è stato valutato su 15 esemplari moribondi di *Sparus aurata* parassitati da *Sparicotyle chrysophrii*. I soggetti sono stati sacrificati, gli archi branchiali isolati e posti in piastra petri in acqua di mare. È stato valutato il numero di parassiti per ogni singolo animale (range 40-70). Si è inoltre provveduto a valutare in continuo la vitalità e motilità dei parassiti su archi branchiali di due soggetti controllo (tempo 0-60 min). Agli archi branchiali parassitati di altri soggetti è stata aggiunta una soluzione 1:1 di acqua ed estratto di *J. Regia* e *C. parqui* rispettivamente. Al T. 0 i parassiti risultavano vivi e vitali una volta esposti alle due soluzioni. Tuttavia a T.60 i parassiti esposti all'estratto di *J. Regia* erano per la maggior parte immobili e staccati dall'epitelio branchiale. Al contrario, i parassiti esposti a *C. parqui*, mantenevano vitalità e movimenti simili ai soggetti non trattati e persistevano sulle branchie. L'esame istologico effettuato su parassiti isolati esposti a *J. regia* mostrano quadri degenerativi gravi di cellule nervose, il che potrebbe giustificare l'effetto paralitico osservato. E' stato inoltre effettuato esame istologico degli organi interni degli sparidi parassitati. L'osservazione conferma lesioni spleniche ascrivibili ad aumento dei centri dei melanomacrofagi, a dimostrazione che l'infestazione da *S. chrysophrii* non ha soltanto un effetto locale a livello branchiale, ma coinvolge l'intero spettro di difese immunitarie dell'ospite. Ulteriori studi dovranno confermare l'attività descritta con questa nota preliminare e precisare meglio quali elementi dell'estratto utilizzato sono responsabili dell'effetto neurotossico sul parassita. Tuttavia i dati presentati suggeriscono che l'estratto di *J. regia* da noi utilizzato potrebbe essere utile nella terapia antiparassitaria integrata in corso di infestazione da *S. chrysophrii*.

AGGIORNAMENTO SULLA PREVALENZA DI *DIPHYLLOBOOTHRIUM LATUM* NELLE PRINCIPALI ZONE SOGGETTE A PESCA COMMERCIALE DEL LAGO DI ISEO

Menconi V.¹, Levetti S.¹, Momo I.², Pastorino P.¹, Mugetti D.¹, Gamberi A.³, Saragaglia C.¹, Arsieni P.¹, Ferrari A.¹, Prearo M.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; ²Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino, Grugliasco (TO); ³Scuola di Specializzazione in Allevamento, Igiene, Patologia delle specie acquatiche e Controllo dei prodotti derivati, Università degli Studi di Milano, Milano.

Il lago d'Iseo è un lago prealpino lombardo, al confine tra la provincia Bergamo e Brescia, e rappresenta un'importante risorsa idrica di significato ambientale, economico e culturale. La condizione biologica delle comunità ittiche del lago è generalmente soddisfacente; i dati disponibili mettono in evidenza che la specie dominante nella zona litorale è il pesce persico (*Perca fluviatilis*), mentre le specie dominanti nella zona pelagica sono generalmente agone (*Alosa fallax fallax*) e coregone (*Coregonus lavaretus*). Per quanto riguarda le specie predominanti nelle zone pelagiche a minori profondità troviamo i ciprinidi, fatta eccezione per la tinca (*Tinca tinca*) che durante i mesi invernali tende a spostarsi nelle zone più profonde.

Il pesce persico può raggiungere i 50 cm di lunghezza, è un predatore stretto, ma in età giovanile si nutre principalmente di invertebrati planctonici. Le sue carni sono molto apprezzate ed è tra le principali specie oggetto di pesca, sia di pescatori professionisti che sportivi.

La difillobotriasi o plerocercosi, causata da *Diphyllbothrium latum* (Cestoda: Pseudophyllidea) è una zoonosi parassitaria con distribuzione cosmopolita avente come ospite definitivo l'uomo ed altri carnivori piscivori e come secondi ospiti intermedi diverse specie ittiche, soprattutto pesce persico, vettori dello stadio infettante ovvero le larve plerocercoidi. La parassitosi, diffusa principalmente nei distretti lacustri settentrionali è riconducibile al consumo di piatti tipici affumicati a freddo, crudi o insufficientemente cotti.

Le acque del lago d'Iseo sono caratterizzate da fattori chimico-fisici idonei al mantenimento del ciclo biologico di *D. latum*, la cui presenza dimostra la mancata applicazione del trattamento dei reflui fognari. L'attività di campionamento è volta alla valutazione della presenza e alla distribuzione degli stadi larvali di *Diphyllbothrium latum* nelle principali aree destinate alla pesca commerciale del lago d'Iseo. La scelta di concentrare i campionamenti alle principali zone del lago dove viene attuata la pesca commerciale contribuisce ad ottenere una mirata valutazione del rischio del potenziale zoonotico di *D. latum*.

Le indagini sono state realizzate nel corso del 2019 ed i campionamenti sono stati possibili grazie alla collaborazione con pescatori professionisti operanti sul territorio sia bresciano che bergamasco. Dalla zona antistante il comune di Costa Volpino (BG) sono stati campionati 246 pesci persico e 6 bottatrici (*Lota lota*), mentre dalla zona nei pressi del comune di Clusane (BS), il prelievo è stato di 89 pesci persico. Tutti i campionamenti sono stati effettuati in diversi di punti di prelievo georeferenziati, distribuiti nelle principali aree deputate alla pesca commerciale. I pesci sono stati trasportati in contenitori termici ed una volta giunti in laboratorio sono state registrate le biometrie (lunghezza, peso totale). L'esame parassitologico è stato condotto per mettere in evidenza la presenza di larve plerocercoidi nel muscolo scheletrico tramite sfilettamento e osservazione macroscopica con transilluminatore.

I risultati ottenuti dai pesci persico di Costa Volpino mostrano una prevalenza del 10,5 %, intensità di infestazione media di 1,11 e abbondanza pari a 0,11; i pesci prelevati a Clusane sono risultati invece tutti negativi. La differenza sulla prevalenza tra le due aree di pesca probabilmente è dovuta ad una corretta gestione dei reflui fognari nelle zone circostanti il comune di Clusane. Il valore della prevalenza totale si attesta quindi al 7,7%, valore che trova pieno riscontro con quanto riportato in bibliografia (P=7,6%) da Gustinelli *et al.* (2016) e nel report finale della ricerca finalizzata di Prearo *et al.* (2016).

STUDIO DEI FATTORI DI RISCHIO PER SAPROLEGNIOSI IN TROTOCOLTURA

Tedesco P.¹, Fioravanti M.L.¹, Dieguez-Uribeondo J.², Sandoval-Sierra J.V.², Menconi V.³, Cook A. C.⁴, Alves M. T.⁴, R. Galuppi¹

¹Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum – Università di Bologna; ²Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Real Jardín Botánico (CSIC-RJB) Madrid; ³Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; ⁴The Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science (Cefas), Weymouth.

Gli oomiceti del genere *Saprolegnia* hanno un'ampia diffusione in ambiente dulciacquicolo e causano importanti perdite economiche nell'allevamento di specie ittiche d'acqua dolce, in particolare salmonidi. Obiettivo della presente ricerca è stato quello di indagare i fattori di rischio in grado di favorire l'insorgenza della saprolegniosi in trotticoltura mediante uno studio epidemiologico longitudinale.

Lo studio è stato condotto in 10 trotticolture (5 in Italia e 5 in Spagna); gli allevamenti sono stati selezionati sulla base della presenza documentata di fattori gestionali considerati rilevanti in riferimento alla saprolegniosi (spremitura dei riproduttori, vaccinazione, selezione, frequenti cambi di vasca, ecc.). Le specie considerate nello studio sono state la trota iridea *Onchorhynchus mykiss*, la trota marmorata *Salmo marmoratus* e la trota fario *Salmo trutta*.

In ciascun allevamento sono state condotte da Febbraio 2017 a Gennaio 2018 visite periodiche durante le quali le vasche oggetto di studio sono state controllate periodicamente per valutare la presenza di lesioni riferibili a saprolegniosi e sono state raccolte informazioni relative a fattori gestionali di diverso tipo, presenza di infezioni concomitanti e mortalità. Durante ciascuna visita sono stati inoltre registrati i parametri ambientali (pH, temperatura e ossigeno disciolto). Il monitoraggio in continuo della temperatura dell'acqua è stato effettuato posizionando un data logger all'interno di ciascuna vasca selezionata. Le specie di *Saprolegnia* circolanti sono state caratterizzate mediante identificazione molecolare dei ceppi isolati da trote campionate in ciascun allevamento nel corso della prima visita.

I dati raccolti sono stati analizzati statisticamente con l'obiettivo di correlare prevalenza di saprolegniosi e mortalità a diverse pratiche gestionali e fattori ambientali.

Tutti gli isolati da trote con segni clinici appartenevano alla specie *Saprolegnia parasitica*.

I risultati delle analisi statistiche indicano che la saprolegniosi rappresenta un'importante causa di mortalità nelle trotticolture italiane e spagnole oggetto di studio.

Con riferimento ai parametri ambientali, è stato evidenziato un contributo importante della temperatura e del pH dell'acqua. In particolare, si è confermato come la prevalenza di *Saprolegnia* sia mediamente più alta durante i mesi freddi (temperatura dell'acqua inferiore a 10°C) evidenziando l'influenza positiva di valori di pH alcalini.

Riguardo agli aspetti gestionali, diverse tipologie di "handling" sono risultate fattori di rischio importanti. In uno degli allevamenti monitorati, è stato rilevato un incremento dei valori di prevalenza per saprolegniosi in seguito a vaccinazione intraperitoneale anche a temperature dell'acqua relativamente elevate (14°C). Inoltre, è stato osservato come frequenti cambi di vasca siano associati a valori di prevalenza più elevati anche quando, in seguito allo spostamento, la densità all'interno delle vasche viene ridotta.

L'identificazione dei fattori di rischio per saprolegniosi è uno step fondamentale per una corretta progettazione ed implementazione di misure di biosicurezza e strategie di gestione finalizzate al controllo di questa parassitosi negli allevamenti di salmonidi.

This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 634429. This publication reflects the views only of the author, and the European Commission cannot be held responsible for any use which may be made of the information contained therein.

LOCALIZZAZIONE OCULARE DI *DERMOCYSTIDIUM* SP. IN UNA CARPA KOI (*CYPRINUS CARPIO* var. *KOI*)

Sirri R.¹, Gustinelli A.¹, Rubini S.², Quaglio F.³, Fioravanti M.L.¹

¹Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Ozzano Emilia (BO); ²IZSLER - Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Ferrara (RA); ³Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione, Università degli Studi di Padova, Padova

Le infezioni da *Dermocystidium* spp. sono state descritte in un ampio range di specie ittiche, sia marine che d'acqua dolce. Esistono più di 20 specie del genere *Dermocystidium* che possono infettare i pesci, tra cui maggiormente descritte: *D. cyprini*, *D. salmonis*, *D. anguillae*, *D. fennicum*, *D. koi*, *D. percae*, *D. sinensis*, *D. kwangtungensis*, *D. branchialis*, *D. cottae*, *D. cuticulare*, *D. erschowi*, *D. gasterostei*, *D. granulorum*, *D. kamilovi*, *D. kubiacevi*, *D. pusula*, *D. vejovskyi*. La posizione tassonomica del genere *Dermocystidium* è tuttora in discussione, sebbene già nel 1992 Dyková e Lom osservarono la presenza di ife associate alle infezioni da *D. koi* suggerendone una natura fungina. Attualmente il genere risulta inserito nella superclasse Mesomycetozoa (Ichthyosporidia) che include protisti "fungus-like" nell'ambito del supergruppo Opisthokonta. Le lesioni da *Dermocystidium* spp. nei pesci sono generalmente rappresentate da formazioni cistiche o nodulari localizzate a livello di cute e pinne ma in alcune specie ittiche, soprattutto salmonidi, sono state descritte a livello muscolare, branchiale, intestinale e sistemico. Nei ciprinidi, le lesioni sono state osservate a temperature dell'acqua comprese tra 15 e 22°C. Il presente studio descrive un caso raro di infezione oculare da *Dermocystidium* sp. in un esemplare di carpa koi (*Cyprinus carpio* var. *Koi*), che presentava un evidente aumento di dimensioni del bulbo oculare destro. L'animale, proveniente da un laghetto privato e morto spontaneamente in corso di terapia antimicrobica, è stato sottoposto ad esame necroscopico e i globi oculari, le branchie ed alcune porzioni degli organi viscerali sono stati fissati in formalina tamponata al 10% per l'esame istologico. Le sezioni ottenute sono state colorate con ematossilina-eosina e PAS. All'esame necroscopico il bulbo oculare destro appariva circondato e parzialmente oscurato da una formazione esofitica biancastra di aspetto granuloso. Allo stereomicroscopio si evidenziavano all'interno del tessuto esofitico peribulbare e nell'umor acqueo numerose cisti biancastre filiformi di circa 3 mm di lunghezza. Al microscopico ottico, le cisti risultavano composte da formazioni rotondeggianti di dimensioni variabili da 5,53 a 12,90 µm di diametro (media= 9,71; d.s.= 1,99; n= 80), riferibili a spore mature di *Dermocystidium* sp., frammiste a stadi di sviluppo di dimensioni inferiori a 5 µm e fortemente vacuolizzati. Le spore, una volta colorate con inchiostro di china o chiarificate con lattofenolo, mostravano: un ampio corpo rifrangente (*refractile body*) o vacuolo centrale, citoplasma periferico, nucleo e da tre a più vacuoli lipidici. All'istologia, i tessuti molli peribulbari, l'iride e l'umor acqueo erano repleti di cisti di forma allungata o rotondeggianti in sezione, aventi una spessa parete eosinofila e contenenti numerose spore a diverso stadio di maturazione. Attorno ad alcune cisti si evidenziava una reazione granulomatosa con cellule epitelioidi e, nel tessuto connettivo circostante, un infiltrato infiammatorio misto costituito da linfociti, plasmacellule, mastociti e alcune cellule giganti, associato ad abbondante tessuto di granulazione. Multifocalmente si osservavano aree emorragiche e necrotiche con la presenza di aggregati basofili riferibili a batteri. Non sono state evidenziate cisti fungine negli altri organi esaminati. In letteratura sono riportate tre descrizioni di localizzazione oculare primaria di *Dermocystidium* sp. in *Gasterosteus aculeatus*, in *Carassius carassius* ed in ibridi di *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachipomus*. La presentazione clinica e le caratteristiche morfologiche delle spore osservate nel caso qui descritto sono compatibili con quelle riportate in letteratura.

EPISODIO DI MORTALITÀ IN GAMBERI DI FIUME (*AUSTROPOTAMOBIOUS PALLIPES*) STABULATI A FINI DI RIPOPOLAMENTO

Volpe E.^{1,2}, Fiocchi E.³, Tosi F.³, Pretto T.³, Cappai N.⁴, Manfrin A.³, Ciulli S.¹

¹Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Cesenatico (FC); ²Cooperativa In Quietè, Pratovecchio-Stia (AR); ³Istituto Zooprofilattico delle Venezie - Centro di Referenza nazionale per le malattie dei pesci, molluschi e crostacei, Legnaro (PD); ⁴Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi, Monte Falterona e Campigna, Pratovecchio-Stia (AR).

Il gambero di fiume italiano, *Austropotamobius pallipes*, rappresenta una specie autoctona importate nella salvaguardia e conservazione di alcuni habitat comunitari. Si tratta infatti di una specie protetta, inserita negli Allegati II e V della Direttiva Habitat (Dir. 92/43/CEE), classificata in pericolo d'estinzione (EN). Le principali minacce che hanno portato ad una riduzione delle popolazioni naturali sono state la perdita di habitat, la pesca non controllata, l'introduzione di specie aliene e la comparsa di malattie; tra queste vi è la peste del gambero, causata da *Aphanomyces astaci*. *Aphanomyces astaci*, appartenente alla famiglia Saprolegniaceae, è un patogeno primario dei decapodi dulciacquicoli, che attacca le aree meno calcificate della cuticola, come la superficie addominale ventrale e le membrane articolari. La sensibilità all'infezione e il decorso clinico variano notevolmente tra le differenti specie di gamberi; con lo sviluppo della diagnostica molecolare, sono stati identificati 5 genotipi (A, B, C, D, E) dell'oomicete.

Negli ultimi anni numerosi paesi europei hanno avviato piani di ripopolamento dell'*Austropotamobius pallipes* al fine di irrobustire le popolazioni già esistenti e re-introdurre nuovi esemplari in zone in cui questa specie non è più presente. Il Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi, Monte Falterona e Campigna nel 2018, nel suo versante toscano, ha avviato un piano di ripopolamento di alcune specie ittiche autoctone e, tra queste, anche il gambero di fiume italiano. A seguito di un'indagine preliminare, sono state individuate 2 popolazioni naturali in buono stato di conservazione dalle quali poter prelevare gli esemplari riproduttori. Questi sono stati inviati ad un impianto d'acquacoltura designato quale luogo idoneo alla riproduzione ed all'accrescimento, al fine del successivo ripopolamento. Nel settembre 2018, 2 gruppi di *Austropotamobius pallipes* adulti sono stati prelevati in natura da differenti torrenti. Circa 3 settimane dopo l'introduzione in impianto, entrambi i gruppi hanno mostrato mortalità e segni clinici tipicamente ascrivibili alla peste del gambero. I soggetti morti o moribondi campionati durante il focolaio sono stati analizzati dal Centro di Referenza Nazionale per le Patologie dei Pesci e Crostacei c/o Istituto Zooprofilattico delle Venezie sede di Padova (NRL-IZS Venezie). I campioni sono stati sottoposti ad analisi molecolare in real-time PCR per rilevare la presenza di *A. astaci* (Vrålstad et al., 2009) e i campioni risultati positivi alla real-time PCR sono stati esaminati tramite PCR end-point (Oidtmann et al., 2006) e successivo sequenziamento. Infine, al fine di identificare il genotipo di *A. astaci* coinvolto nel focolaio, è stata applicata una PCR end-point specifica per genotipo (Minardi et al., 2018).

Tutti i campioni testati durante l'evento di mortalità sono risultati positivi in real-time PCR per *A. astaci* e i risultati sono stati confermati con PCR end-point e sequenziamento. Tre campioni positivi per la peste del gambero sono risultati appartenenti alla linea genetica D, utilizzando la PCR end-point con primer specifici per le diverse linee genetiche. In circa 2 mesi, il focolaio ha portato al 100% di mortalità in entrambi i gruppi inseriti in impianto.

La PCR end-point con primer specifici per genotipo, sviluppata da Minardi e colleghi, è semplice ed efficace se eseguita su campioni cuticolari ma richiede un livello elevato di infezione pertanto idonea all'utilizzo durante l'evento di mortalità, ma non per la valutazione dello stato di portatore.

La presenza di *A. astaci* genotipo D, solitamente trasportato da esemplari ascrivibili al genere *Procambarus*, pone la domanda su come gli animali coinvolti nel focolaio possano essere entrati in contatto con esemplari di *Procambarus spp.* o con le spore degli oomiceti, in quanto nell'area idrografica di provenienza degli adulti e nel bacino idrografico sul quale insiste l'allevamento non è riportata la presenza di questa specie. Attualmente sono in corso ulteriori campionamenti in natura per cercare di stabilire una possibile via di ingresso dell'oomicete in impianto.

"SMALL VESSEL DISEASE" O "CORONARY MICROVASCULAR DISEASE": IL PESCE SPADA COME MODELLO DI PATOLOGIA COMPARATA

Capucchio M.T.^{1,2}, Chiappino L.¹, Sereno A.¹, Mugetti D.³, Mignone W.³, Garibaldi F.⁴, Prearo M.³, Guarda F.¹

¹Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino; ²ISPA CNR, Grugliasco (Torino); ³Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; ⁴Dipartimento di Scienze della Terra, dell'Ambiente e della Vita, Università degli Studi di Genova

“*Small vessel disease*” (SVD) o “*Coronary microvascular disease*” sono nomi diversi che stanno ad indicare una condizione patologica da tempo descritta in medicina umana, che si associa frequentemente ad ischemie miocardiche e/o demenza. Trattasi di una patologia del microcircolo che colpisce principalmente cuore e cervello, organi con un’anatomia vascolare molto simile con arterie distribuite sulla superficie e perfusione interna ottenuta tramite arterie penetranti.

In medicina umana la SVD cardiaca coinvolge le arteriole penetranti ed il plesso microvascolare subendocardico. Il fenomeno conduce spesso a coronariopatie acute o croniche e ad infarti. La patologia può anche manifestarsi in forma sistemica coinvolgendo altri distretti, quali in particolare rene e retina. Spesso aterosclerosi o alta pressione ne costituiscono fattori di rischio; non si esclude tuttavia la predisposizione genetica. Stress ossidativi e precoce invecchiamento vascolare sono considerati di particolare importanza nel progresso della SVD.

La SVD si associa a fenomeni proliferativi e degenerativi del microcircolo coronarico, oltre a disfunzioni endoteliali, alterata permeabilità vasale, alterazioni della matrice extracellulare della tonaca media dei piccoli vasi arteriosi, degenerazione e fibrosi perivascolare.

In questo studio si sono osservate lesioni proliferative del microcircolo coronarico con accentuato aumento delle cellule muscolari lisce in 15 esemplari di pesce spada (*Xiphias gladius*) su 82 regolarmente pescati per il consumo umano. Le lesioni osservate durante l’esame istologico di porzioni selezionate di cuori consistevano in fenomeni proliferativi della tonaca muscolare liscia delle microarteriole della parete ventricolare. I lumi in alcuni casi erano quasi totalmente occlusi, ma non sono state osservate necrosi del miocardico, né fibrosi. In tutti i casi di SVD erano presenti negli animali anche fenomeni degenerativo/necrotici e/o flogistici a carico del cuore che ne impedivano il normale funzionamento (pericarditi, granulomi parassitari, endocardiosi valvolare). In un caso, sono state altresì osservate cellule di Anitschkow nella tonaca media arteriolare degenerata. Queste lesioni sono analoghe a quelle descritte nell’uomo nella cosiddetta SVD.

Gli autori ritengono pertanto che il pesce spada potrebbe costituire un modello animale di studio della patogenesi di questo disordine vascolare, benché il meccanismo di insorgenza in questa specie marina debba essere ancora chiarito.

LEIOMIOMA IN RIPRODUTTORE DI SPIGOLA (*DICENTRARCHUS LABRAX*)

Iaria C.¹, Capparucci F.¹, Natale S.¹, Panebianco R.², Puleio R.³, Marino F.¹

¹Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Università di Messina (ME); ²Panittica Italia, Torre Canne di Fasano (BR); ³Istituto Zooprofilattico della Sicilia, Palermo (PA)

Questo studio descrive un caso di leiomioma gastrico spontaneo in un riproduttore di spigola (*Dicentrarchus labrax*) proveniente dall'allevamento Panittica Italia. Sono state eseguite analisi istologiche, istochimiche e immunoistochimiche per identificare la massa. Il tumore è stato trovato all'interno della cavità celomatica, protrudente dalla parete esterna dello stomaco, di 5.4 cm in diametro, di forma botroidale, scarsamente vascularizzato, con margini non ben definiti, di colore grigio-biancastro e consistenza solida. In sezione, il tumore era leggermente lobulare, di aspetto lardaceo, con cavità vuote all'interno che mostravano una superficie a spirale e trabecolata. Microscopicamente, la lesione appariva debolmente circoscritta e non capsulata, ed era composta da cellule fusiformi con un orientamento parallelo in fasci intrecciati o occasionalmente con andamento vorticoso. I nuclei contenevano nucleoli allungati con estremità smussate. Figure mitotiche, pleomorfismo o necrosi erano assenti. Inoltre, non sono state osservate infiltrazioni nei tessuti circostanti e metastasi delle cellule tumorali. La colorazione tricromica di Mallory identificava le cellule tumorali e le normali fibre muscolari marcate in rosso, e solo una piccola quantità di fibre di collagene veniva osservata nello stroma. Le cellule tumorali presentavano una scarsa quantità di citoplasma eosinofilo entro confini cellulari distinti. L'epitelio della mucosa era intatto e le cellule neoplastiche sottostanti non risultavano infiltranti verso la mucosa. Nella diagnosi differenziale venivano considerate altre possibili tipologie tumorali quali, schwannoma, fibroma e rhabdomyosarcoma. L'esame immunoistochimico ha mostrato una positività per actina muscolo liscio, vimentina e desmina (Sirri et al. 2015), mentre l'espressione di S-100 era negativa. Sulla base di risultati istologici e immunoistochimici è stata formulata la diagnosi di leiomioma. Questo studio rappresenta il primo report di leiomioma gastrico in teleostei. La carenza di dati in letteratura inerenti i leiomiomi e i tumori gastrici in generale nei teleostei giustifica l'interesse del presente report, motivato anche dal fatto che la segnalazione riguarda un esemplare di riproduttore proveniente da acquacoltura. Sebbene i riproduttori presentino una più elevata probabilità di sviluppare formazioni tumorali, considerando la loro lunga carriera produttiva (vita), a differenza degli esemplari destinati alla produzione, che avendo una vita più breve, difficilmente possono sviluppare patologie solitamente correlate alla senescenza, sporadici risultano tuttavia gli studi di oncologia riguardanti teleostei allevati di età avanzata.

Ulteriori approfondimenti andrebbero fatti al fine di caratterizzare la possibile eziologia di patologie tumorali nei teleostei e le loro eventuali correlazioni con le procedure di allevamento e alimentazione.

Sirri R., Bianco C., Beraldo P., Mandrioli L., Pulcirenti C., Brachelente C., Galeotti M. & Sarli G. (2015). Rhabdomyosarcoma of soft tissues in an adult Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*). J. Comp. Pathol, 153:190–195.

CO-INFEZIONI MULTIPLE E STRESS AMBIENTALI RESPONSABILI DI UN FOCOLAIO DI MORTALITÀ CRONICA IN GIOVANILI DI STORIONE

Ciulli S.¹, Volpe E.¹, Errani F.¹, Tura G.², Renzi A.², Toffan A.³, Pretto T.³, Mordenti O.¹, Sirri R.², Sarli G.², Serratore P.¹, Mandrioli L.¹

¹Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum, Università di Bologna, Cesenatico (FC); ²Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum, Università di Bologna, Ozzano Emilia (BO); ³Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova.

L'interesse verso l'allevamento degli storioni è, negli ultimi anni, in continuo aumento, sia per la produzione di carne e caviale che per attività di ripopolamento. Fra le specie di notevole interesse è incluso anche lo storione ladano (*Huso huso*, Linnaeus, 1758) noto anche come storione beluga, specie attualmente classificata come "critically endangered". Nonostante ciò, le attuali conoscenze sui problemi sanitari di questa specie ed in generale sugli storioni sono ancora limitate.

I principali focolai di mortalità in storioni sono stati associati a herpesvirus, mimivirus, feoifomicosi e batteri. In *Huso huso* la letteratura riporta infezioni batteriche sostenute da *Vibrio vulnificus*, *Aeromonas hydrophila* e *Yersinia ruckeri*.

Questo lavoro rappresenta un'indagine preliminare su un focolaio di mortalità cronica osservato in giovanili di *Huso huso* stabulati in un sistema a ricircolo con acqua termostata a 19°C. I soggetti presentavano segni neurologici quali nuoto circolare, iperattività agli stimoli alternata a prolungato riposo sul fondo della vasca. I soggetti campionati sono stati sottoposti ad indagini microbiologiche, molecolari, citologiche ed istopatologiche per l'identificazione di eventuali patogeni presenti.

All'esame macroscopico sono state osservate deformità del corpo, rammollimento dei muscoli epiassiali e dermatite ulcerativa multifocale. In alcuni soggetti era presente un versamento celomatico siero-emorragico che all'esame citologico si è mostrato settico (presenza di bacilli Gram negativi e/o ife fungine). All'esame batteriologico è stata rilevata una setticemia attribuita a *Aeromonas veronii*, *Shewanella* spp. e *Citrobacter freundii* e dalle lesioni di un soggetto è stata isolata *Aeromonas hydrophila*. L'esame virologico in coltura cellulare (linea WSSK) e la ricerca molecolare diretta di betanodavirus, herpesvirus dei pesci, adenovirus e mimivirus (AcIV e NV-like virus) hanno dato esito negativo.

L'esame istopatologico ha mostrato interessanti risultati. In particolare, è stata osservata rarefazione del tessuto ematopoietico linfoide in molti organi (pericardio, milza, rene). Inoltre, nei soggetti con deformità del corpo e rammollimento dei muscoli epiassiali, erano presenti atrofia muscolare ed edema interstiziale associati a degenerazione ed atrofia dei neuroni gangliari extra-spinali. L'esame istologico ha inoltre confermato lo stato setticemico di alcuni soggetti evidenziando la presenza di batteri e/o miceti. Infine, altri ritrovamenti, quali nefrocalinosi e ialinosi della parete dei vasi sono stati evidenziati ed interpretati come risposta a stress ambientali come già descritto in letteratura negli storioni.

Sulla base degli attuali riscontri, queste alterazioni patologiche sembrano il risultato della somma di stress ambientali e delle co-infezioni batteriche multiple. In assenza di altri agenti biologici primari, prolungati stress ambientali possono essere considerati la causa della compromissione del sistema immunitario, che ha facilitato l'ingresso dei batteri e miceti opportunisti. I segni di setticemia quali la dermatite ulcerativa e il versamento celomatico siero-emorragico sarebbero subentrati e si sarebbero aggiunti ai danni patologici già presenti andando a costituire il reperto macroscopico dominante. Questi disturbi di circolo, potrebbero di conseguenza aver indotto il danno neuromuscolare. Ulteriori analisi sono in corso al fine di stabilire se altri agenti patogeni primari possano aver partecipato alla compromissione del sistema immunitario.

1000 WAYS TO DIE IN AQUATIC ANIMALS

Corti I.¹, Lanteri G.², Malandra R.³, De Vico G.⁴, Marino F.⁵

¹Agenzia di Tutela della Salute dell'Insubria (CO); ²Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Messina (ME); ³Responsabile S.S. Mercati Generali, Agenzia di Tutela della Salute della Città Metropolitana di Milano (MI); ⁴Dipartimento di Biologia, Università degli studi di Napoli, Federico II (Na); ⁵Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Università di Messina (ME).

Durante l'attività routinaria del medico veterinario ispettore ittico e del ricercatore universitario, saltuariamente si riscontrano negli organismi acquatici quadri macroscopici eclatanti che possono causare importanti risentimenti morfologico-funzionali fino a condurre, in alcuni casi, alla morte del soggetto.

Nell'ambito di questo lavoro vengono presentati alcuni casi che nascono dall'esperienza acquisita presso il Centro di Ittiopatologia Sperimentale della Sicilia (CISS) e il Mercato Ittico di Milano. Per mettere in evidenza questi casi è essenziale effettuare l'esame autoptico con una buona tecnica, al fine di non alterare i quadri patologici non sempre facilmente individuabili.

Un caso riscontrato è quello di un tursiope (*Tursiops truncatus*) (Macrì et al., 1999) emerso deceduto nel Porto di Messina e sottoposto a necropsia: esso mostrava un quadro di grave e diffuso enfisema polmonare, e dall'esame delle vie aeree superiori si evidenziava inaspettatamente la presenza di una serpe di mare (*Ophisurus serpens*) nel condotto tracheale: probabilmente la preda, una volta entrata per errore in trachea, non era riuscita a liberarsi causando la morte del tursiope per soffocamento. Un branzino (*Dicentrarchus labrax*) allevato presso un impianto siciliano presentava rigonfiamento addominale; all'esame autoptico si evidenziava una cisti di dimensioni notevoli rispetto al soggetto, occupante quasi completamente la cavità addominale e correlata ad un fenomeno pregresso di nefrocalinosi. Un esemplare di occhiata (*Oblada melanura*) presentava un'infestazione massiva atipica di *Philometra obladae*, della cavità celomatica. Questo è un caso raro in natura, in cui l'infestazione da parte del parassita prende il sopravvento sul soggetto parassitato, causandone infine la morte. Un altro caso particolare è quello che ha coinvolto una tartaruga di mare (*Caretta caretta*) ritrovata agonizzante nello Stretto di Messina e deceduta poche ore dopo e recapitata dal Corpo Forestale dello Stato. All'autopsia si riscontrava un caso di intussuscezione intestinale retrograda causata da un'onda antiperistaltica generata dall'azione meccanica di un amo (De Vico, 2003). Infine, una murena (*Muraena helena*) pescata nel Mar Ionio (FAO 37.2.2, Taranto) ritrovata presso il Mercato Ittico di Milano durante una visita veterinaria ispettiva presentava una tumefazione monofocale di circa 3 cm protrudente sulla porzione dorsale del pesce. Nel corso dell'autopsia è stata messa in evidenza la presenza di un sarago sparaglione (*Diplodus anularis*) di circa 13 cm dislocato dal tratto esofageo fino nel sottocute della porzione caudale della testa, perpendicolarmente rispetto all'asse longitudinale della murena. La pinna dorsale del pesce ingerito aveva perforato lo stomaco; conseguentemente, il contenuto luminale gastrico si era riversato parzialmente nella cavità celomatica, contribuendo alla morte dell'animale.

I casi descritti raccolti negli anni dimostrano che, seppur rari in natura, questi eventi destano sempre un certo interesse anatomo-patologico, specialmente quando causano decessi inusuali degli animali. Dal punto di vista puramente ispettivo, i soggetti o le loro parti coinvolte che presentino alterazioni fisiopatologiche non dovranno essere immessi sul mercato.

CO-INFEZIONE DA *MYCOBACTERIUM* SP., *HAPLOSPORIDIUM PINNAE* E ALTRI PATOGENI IN ESEMPLARI DI *PINNA NOBILIS* IN ITALIA E SPAGNA (MAR MEDITERRANEO): QUALI LE CAUSE DELLA MORTALITÀ?

Carella F.¹, Antuofermo E.^{2,3}, Farina S.⁴, Salati F.⁵, Mandas D.⁵, Prado P.⁶, Marino F.⁷, Fiocchi E.⁸, Pretto T.⁸, Susini F.⁹, De Vico G.¹

¹Department of Biology, University of Naples Federico II, MSA, 80126, Naples, Italy; ²Department of Veterinary Medicine, University of Sassari, Sassari, Italy; ³Mediterranean Center For Disease Control (MCDC), 07100 Sassari, Italy; ⁴IMC International Marine Centre, Torregrande, 09170 Oristano, Italy; ⁵Laboratorio di Ittiopatologia e Acquacoltura, IZS della Sardegna, Oristano; ⁶IRTA-Sant Carles de la Ràpita, Sant Carles de la Ràpita, Spain; ⁷Department of Chemical, Biological, Pharmaceutical and Environmental Sciences, University of Messina, 98166 Messina, Italy; ⁸IZS delle Venezie, Legnaro (Padova), Italy; ⁹IZS Sperimentale del Lazio e Toscana, Italy

A partire dal 2016, eventi di mortalità di massa del bivalve *P. nobilis* sono stati registrati nel Mar Mediterraneo, con una prima segnalazione in Spagna a cui hanno fatto seguito altre in Italia, Grecia e Francia. Inizialmente, un parassita appartenente al phylum *Haplosporidium*, recentemente nominato *Haplosporidium pinnae* (Catanese et al., 2018), è stato individuato come responsabile della mortalità. Successivamente, altri patogeni di natura batterica, fra cui un micobatterio, sono stati associati agli eventi morbosi (Carella et al., 2019). In questo lavoro, è stato condotto un studio su esemplari moribondi di *P. nobilis* in Italia (Campania, Toscana, Sicilia, Sardegna e Puglia) e Spagna (Catalogna) fra il 2018 e il 2019. L'esame istopatologico e molecolare di 27 esemplari di *P. nobilis* esaminati ha rivelato la presenza di diversi tipi di agenti patogeni associati alle lesioni tissutali, morbidità e mortalità. Nelle diverse aree sono state registrate specie batteriche quali *Mycobacterium* sp., *Vibrio* sp, *Haplosporidium pinnae* e *Perkinsus* sp. I micobatteri, precedentemente riportati in campioni di Campania e Sicilia, sono stati osservati in tutte le altre aree analizzate. In particolare, l'analisi delle regioni *hsp65* e *ITS* (Internal Transcriber Spacer) supportano la presenza di una nuova specie di micobatterio che colpisce *P. nobilis*, filogeneticamente vicino a *M. triplex* e appartenente al complesso *M. simiae* e *M. sherrisi*. La presenza di parassiti ascrivibili al genere *Perkinsus* sp., morfologicamente simili a *P. mediterraneus* è stata osservata in 2 su 3 degli animali analizzati in Sardegna. I risultati preliminari di questo studio suggeriscono che *Mycobacterium* sp., *Vibrio*, *H. pinnae* e *Perkinsus* sp. agiscano sinergicamente e che le co-infezioni possano essere attivate da cause immunosoppressive comuni ancora sconosciute.

Carella F., Aceto S., Pollaro F., Miccio A., Iaria C., Carrasco N., Prado P., De Vico G., 2019. A mycobacterial disease is associated with the silent mass mortality of the pen shell *Pinna nobilis* along the Tyrrhenian coastline of Italy. Scientific Reports 9(1):2725, DOI: 10.1038/s41598-018-37217-y.

Catanese G, Grau A, Valencia JM, Garcia-March JR, Vázquez-Luis M, Alvarez E, Deudero S, Darriba S, Carballal MJ, Villalba A, (2018) *Haplosporidium pinnae* sp. nov., a haplosporidan parasite associated with mass mortalities of the fan mussel, *Pinna nobilis*, in the Western Mediterranean Sea. J Invertebr Pathol. 157:9-24. doi: 10.1016/j.jip.2018.07.006.

ABSTRACT Poster

INDAGINE SUL RUOLO DEL CORMORANO NELLA TRASMISSIONE DI ALCUNI VIRUS PATOGENI DEI PESCI IN PROVINCIA DI TRENTO

Andreatta S.¹, Franzago E.¹, Dalla Pozza M.¹, Toson M.¹, Quartesan R.¹, Bille L.¹, Baldessari F.², Giovannini R.³, Dellamaria D.¹, Toffan A.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe); ²Servizio Foreste e Fauna – Ufficio faunistico della Provincia Autonoma di Trento; ³Associazione Cacciatori Trentini

Con Deliberazione della Giunta Provinciale n.2218 del 1 ottobre 2010 la Provincia Autonoma di Trento (PAT) ha predisposto un piano di contenimento e prevenzione dei danni da cormorano che prevede azioni di disturbo e abbattimenti rafforzativi sulle aree di alimentazione di maggior pregio ittiofaunistico. Il cormorano (*Phalacrocorax carbo*) rappresenta un elemento di interferenza negativa verso specie ittiche di alto valore naturalistico come Trota marmorata (*Salmo marmoratus*) e Temolo (*Thymallus thymallus*). Alcuni studi hanno dimostrato che gli uccelli ittiofagi come aironi e cormorani possono fungere da vettore per diverse patologie dei pesci, sia di natura batterica che virale (Koel et al., 2010; Peters and Neukirch, 1986; OIE, Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, 2019).

Lo scopo del lavoro è stato quello di valutare il potenziale ruolo del cormorano nella diffusione delle principali patologie virali dei salmonidi e dei ciprinidi (setticemia emorragica virale - VHS, necrosi ematopoietica infettiva - IHN, herpesvirus dei ciprinidi CyHV e necrosi pancreatica infettiva - IPN) e di definire le sue abitudini alimentari.

Nel periodo di studio (dicembre 2015- marzo 2019) sono stati condotti 4 piani di abbattimento dei cormorani nella PAT per un totale di 160 animali abbattuti e in seguito conferiti presso l'IZSVe. Gli abbattimenti dei cormorani sono stati estesi a tutta la PAT lungo il corso dei fiumi principali (Adige, Noce, Avisio, Sarca, Chiese, Brenta). Da ciascun cormorano è stato eseguito un tampone cloacale per la ricerca di VHS, IHN a cui si è aggiunta la ricerca di IPN per la sola stagione 2017-2018 (n. 32 cormorani). È stato aperto il gozzo e lo stomaco di tutti i cormorani al fine di evidenziare la presenza di eventuali pesci al loro interno; in 67/160 (41.9%) cormorani sono stati individuati dei pesci e l'identificazione della specie ittica, ove possibile, è stata fatta macroscopicamente e/o attraverso l'utilizzo di metodiche biomolecolari. Dai salmonidi analizzabili (pool di organi) è stata eseguita la ricerca dei virus VHS e IHN (n.10) e IPN (n.1) mentre dai ciprinidi è stata eseguita la ricerca di CyHV (n.20).

Tutte le analisi effettuate sui cormorani e sui pesci rinvenuti hanno dato esito negativo per le patologie virali ricercate ad eccezione di 2 ciprinidi che sono risultati positivi per CyHV nella stagione 2015-2016. I pesci rinvenuti nell'apparato digerente dei cormorani sono stati 75; di 73 è stato possibile identificare la specie ed essi sono risultati appartenenti a più di una decina di specie ittiche diverse. Le famiglie più rappresentate sono state quella dei ciprinidi (51%), dei persici (30%) e dei salmonidi (18%). In bibliografia non c'è evidenza di studi sulla capacità dei cormorani di trasmettere i Novirhabdovirus, genere di cui fanno parte i virus della VHS e della IHN. Il presente studio ha messo in evidenza come nella ittiofauna presente nell'apparato digerente dei cormorani e nei cormorani stessi non vi sia stata rilevazione di VHS e/o IHN, le due patologie virali dei salmonidi notificabili ai sensi del decreto legislativo 148/2008 e per le quali la PAT ha in atto un programma di riconoscimento/mantenimento dell'indennità a livello provinciale.

Koel T. M., Kerans B. L., Barras S. C., Hanson K. C. & Wood J. S. (2010). Avian Piscivores as Vectors for *Myxobolus cerebralis* in the Greater Yellowstone Ecosystem. Transactions of the American Fisheries Society, 139:976–988.

OIE (2019). Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Chapter 2.3.4 e Chapter 2.3.10.

Peters F. and Neukirch M. (1986). Transmission of some fish pathogenic viruses by the heron, *Ardea cinerea*. Journal of fish diseases, 9:539-544

CONFRONTO TRA PREVALENZA ATTESA E PREVALENZA ATTUALE IN UNA POPOLAZIONE DI GIOVANILI DI STORIONE RUSSO (*ACIPENSER GUELDENSTAEDTII*) CON IRIDOVIROSI

Bona M.C.¹, Ceresa L.², Mugetti D.¹, Righetti M.¹, Pastorino P.¹, Arsieni P.¹, Ru G.¹, Prearo M.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; ²Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Torino, Grugliasco (TO)

L'Iridovirosi sostenuta da *Acipenser Iridovirus European* (AcIV-E) è una patologia virale che rappresenta una problematica emergente per le storionicoltive italiane.

L'agente eziologico, AcIV-E, è un desossiribovirus appartenente all'ordine Megavirales (o Nucleocytoplasmic Large DNA Viruses, NCLDV) attualmente non coltivabile su monostrato cellulare. Le descrizioni di questo microrganismo sono recenti: i primi *case report* della patologia sono infatti documentati da Ciulli *et al.* e Bigarré *et al.*, rispettivamente negli anni 2016 e 2017.

Sono note poche informazioni su questa virosi: sembra che lo storione russo (*Acipenser gueldenstaedtii*) sia la specie maggiormente sensibile, nonostante lo spettro d'ospite sia ampio e comprenda la gran parte degli storioni allevati sul territorio nazionale, ibridi inclusi. Le forme cliniche si manifestano principalmente in soggetti giovanili di storione russo, causando mortalità cumulative anche molto elevate.

Uno di questi episodi viene preso in considerazione proprio in questo lavoro, in cui si è cercato di stimare la reale prevalenza di Iridovirosi in una partita di giovanili di storione russo sottoposti a *stamping-out* a seguito del riscontro di positività ad AcIV-E.

Nel gennaio 2018 è stato inviato al Laboratorio Specialistico di Ittiopatologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Torino (IZSTO) un lotto di 930 giovanili di storioni russi, di peso compreso tra 3 e 5 g; i pesci provenivano da un allevamento del Nord Italia che aderisce volontariamente al monitoraggio sanitario per la ricerca di AcIV-E. Il motivo per il quale si è deciso di condurre uno studio epidemiologico sulla presente partita di pesci è che, essendo stata sottoposta ad abbattimento totale (*stamping-out*), rappresentava una popolazione definita di storioni russi. Il fine di questa prova è stato quello di determinare il numero minimo di soggetti necessari per il campionamento in pool, più economico e veloce delle analisi in singolo, per ottenere dei risultati di prevalenza il più possibile simili alla prevalenza reale della malattia. Non essendo nota la prevalenza di AcIV-E in Italia, è stata utilizzata una prevalenza del 70% stimata in base ai dati raccolti dall'IZSTO ed è stato quindi calcolato su base statistica che la numerosità di pool più efficiente, in termini di economicità dell'analisi e di proporzione di stime "valide", fosse costituita da 100 pool composti da 3 soggetti ciascuno. I pool sono stati analizzati mediante un saggio di TaqMan real-time PCR, il cui target è rappresentato da una porzione del gene codificante la proteina maggiore del capsido (*major capsid protein* o MPC).

Questa determinazione della numerosità campionaria per le analisi è preliminare a prove successive che consistono nel ripetere la PCR real-time in singolo e di nuovo in pool, per confrontare i risultati ottenuti e determinare se l'analisi in pool restituisca una stima dei dati di prevalenza corrispondente alla prevalenza reale.

Dall'analisi dei dati con una prevalenza attesa del 70,5%, (IC95% 58,98-84,57) è emersa una prevalenza del 98% (IC 95% 93-100). Vista la discrepanza tra la prevalenza ottenuta e quella attesa, è necessario replicare la simulazione, assumendo una prevalenza stimata più alta per ripetere le analisi biomolecolari. La stima della corretta prevalenza potrà aiutare a stimare la numerosità migliore per la costituzione di pool di soggetti da testare preliminarmente rispetto ai singoli, in modo da ottimizzare il processo diagnostico nei confronti di Iridovirosi.

VALUTAZIONE DELLA PRESENZA DI CARP EDEMA VIRUS (CEV) IN CIPRINIDI DI DIFFERENTE PROVENIENZA: DATI PRELIMINARI

Mugetti D.¹, Giaccone F.², Menconi V.¹, Levetti S.¹, Pastorino P.¹, Arsieni P.¹, Prearo M.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; ²Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino, Grugliasco (TO)

La famiglia *Poxviridae* è costituita da un gruppo di virus a DNA a doppio filamento (dsDNA) in grado di infettare differenti specie animali, tra cui alcuni organismi acquatici. Sono segnalate nei pesci 3 differenti patologie causate da Poxvirus: *Salmon Gill Poxvirus Disease* (SGPVD) nel salmone atlantico (*Salmo salar*), *Proliferative Branchitis* nell'ayu (*Plecoglossus altivelis*) e *Koi Sleepy Disease* (KSD). Quest'ultima patologia, causata da un virus noto come *Carp Edema Virus* (CEV), ha dato episodi di mortalità in carpe comuni (*Cyprinus carpio*) e carpe koi (*Cyprinus carpio* var. koi). La prima segnalazione della malattia risale agli anni '70 in Giappone, mentre in Europa la malattia è stata riscontrata per la prima volta nel 2009 in Inghilterra. L'infezione da CEV si manifesta clinicamente con edema addominale e grave danno branchiale, che possono portare ad elevati tassi di mortalità nelle popolazioni infette. Il nome "*Koi Sleepy Disease*" si riferisce alla letargia che può colpire soggetti adulti di carpe koi affetti da CEV. I dati riguardanti l'epidemiologia della malattia sono frammentari, così come quelli riguardanti possibili altre specie di ciprinidi che potrebbero fungere da potenziali *reservoir* del virus. Per cercare di ottenere nuove conoscenze riguardo a quest'ultimo punto, è stato condotto un monitoraggio su diverse specie di ciprinidi qui descritto.

Sono state selezionate 4 tipologie di ambiente da cui campionare i pesci oggetto delle analisi: allevamenti, ambienti naturali (laghi, fiumi), laghetti di pesca sportiva e acquari privati. Sono stati campionati 80 pesci di 9 diverse specie (*Abramis brama*, *Aspius aspius*, *Carassius auratus*, *Carassius carassius*, *Ctenopharyngodon idella*, *Cyprinus carpio*, *Cyprinus carpio* var. koi, *Scardinius erythrophthalmus*, *Squalius cephalus*, *Tinca tinca*), rispettivamente suddivisi per le tipologie precedentemente descritte: 27 pesci da allevamenti, 44 da laghi e fiumi del Nord-Ovest Italia, 5 da laghetti di pesca sportiva e 4 provenienti da privati. Per tutti i soggetti è stato prelevato un frammento di arco branchiale, da cui è stato estratto il DNA per le successive analisi biomolecolari.

La diagnosi di CEV è stata condotta mediante un protocollo di nested PCR utilizzando primer CEV forB e CEV revJ per la prima reazione, CEV forB-int e CEV revJ-int per la seconda; le condizioni utilizzate sono state le medesime per entrambe le reazioni (Matras *et al.*, 2016). I positivi sono stati confermati sequenziando gli amplificati ottenuti nella seconda reazione.

Tutti i campioni analizzati sono risultati negativi alle analisi biomolecolari, ad eccezione di un esemplare di tinca proveniente da un lotto di 5 soggetti allevati in Nord Italia. L'assenza di segni clinici specifici fa propendere per un ritrovamento casuale del virus.

In un lavoro di infezione sperimentale di varie specie di ciprinidi (Matras *et al.*, 2019), la tinca è stata indicata come resistente al CEV. Al contrario, il nostro lavoro ha permesso di evidenziare una positività in queste, sebbene il significato di questo risultato sia da chiarire. Il prosieguo del monitoraggio aiuterà a fornire ulteriori utili informazioni sulla KSD, in relazione ai diversi ambienti studiati e alle possibili specie *reservoir*.

MATRICI “ATIPICHE” PER LA DIAGNOSI DI MICOBATTERIOSI ITTICHE: I FILTRI D’ACQUARIO

Mugetti D., Pastorino P., Menconi V., Levetti S., Righetti M., Canola S., Dondo A., Prearo M.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d’Aosta, Torino

Le micobatteriosi ittiche sono patologie che affliggono gli organismi acquatici, causate da bacilli del genere *Mycobacterium*. Possono colpire indifferentemente pesci d’acqua dolce o salata, allevati, tenuti in acquario o in ambienti naturali. Il decorso di tali patologie è spesso cronico, con assenza di sintomi esterni patognomonicamente: possono essere osservate lesioni aspecifiche, comuni ad altre malattie conosciute dagli operatori del settore ittico. La lesione tipica che può far propendere per la diagnosi di micobatteriosi ittiche, è la presenza di noduli miliari sulla superficie di diversi organi parenchimatosi (milza, fegato, rene). Va da sé che per effettuare la suddetta diagnosi, occorra inevitabilmente sacrificare alcuni soggetti in cui si sospetta la malattia. Negli ultimi anni si è assistito ad un aumento di sensibilità nei confronti degli animali domestici, che ha portato ad un più o meno accentuato processo di “antropomorfizzazione” degli stessi, tra cui anche dei pesci d’acquario. Per questo motivo, alcuni proprietari sono riluttanti a sacrificare uno o più soggetti per scopi diagnostici e richiedono l’uso di metodi alternativi per la diagnosi di microrganismi patogeni eventualmente presenti nei loro acquari. A tal proposito, è stata valutata l’efficacia di filtri d’acquario per la diagnosi di micobatteriosi ittiche. Sono stati analizzati 11 filtri d’acquario nel periodo compreso tra gennaio 2017 e agosto 2019, di cui 7 provenienti da acquari privati e 4 installati dal personale del Laboratorio di Ittiopatologia dell’IZSPLV di Torino in un allevamento con accertata presenza di micobatteriosi. Il protocollo utilizzato è stato lo stesso routinariamente adoperato per la ricerca di micobatteri in organismi acquatici. Si è quindi proceduto con l’omogeneizzazione di parte del filtro in stomacher, decontaminazione e centrifugazione. Il pellet così ottenuto è stato inoculato con un’ansa sterile su terreni Löwenstein-Jensen e Stonebrink medium, incubati per 2 mesi rispettivamente a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $37\pm 1^{\circ}\text{C}$. Al termine del periodo di incubazione, le colonie cresciute sono state saggiate con la colorazione di Ziehl-Neelsen ed identificate mediante metodiche di biologia molecolare.

In seguito alle analisi svolte, sono emerse diverse criticità legate all’utilizzo di filtri d’acquario per la diagnosi di micobatteriosi ittiche. Il primo punto da risolvere riguarda l’omogeneizzazione del campione: esistono infatti diverse tipologie di filtri d’acquario, alcune delle quali non vengono adeguatamente sminuzzate dallo stomacher. Un’omogeneizzazione non idonea va ad inficiare i passaggi successivi delle analisi, per cui occorrerà identificare un adeguato metodo che possa essere utilizzato indifferentemente per ogni situazione o studiare protocolli specifici a seconda della tipologia di filtro analizzato. Il secondo punto critico su cui ci si è soffermati è stato la decontaminazione del campione, effettuata mediante soluzione acquosa all’1,5% di cetilpiridinio cloruro (HPC). Va tenuto conto che i filtri rappresentano matrici con alta carica microbica, per cui una singola decontaminazione spesso non è sufficiente. Si sono rese necessarie decontaminazioni multiple per diversi campioni analizzati: prove successive dovranno individuare il numero di passaggi con HPC o altri agenti decontaminanti idoneo alla crescita dei soli micobatteri su terreni solidi. L’ultimo punto da chiarire è il significato che assumono gli isolati cresciuti su terreni al termine dell’incubazione: va infatti ricordato che i micobatteri non tubercolari sono germi ambientali, quindi naturalmente presenti anche nell’acqua. Occorre perciò valutare correttamente gli isolati derivanti dai filtri, per non incorrere in errori nella diagnosi.

Per testare la reale efficacia dei filtri d’acquario per la diagnosi di micobatteriosi ittiche occorre quindi ancora confrontare gli isolati ottenuti da diverse matrici, eseguendo in parallelo esami colturali su organi di esemplari sacrificati allo scopo.

INDAGINE SULLA PRESENZA DI BATTERI PATOGENI NEI PESCI ORNAMENTALI INTRODOTTI NEL LAZIO

Mascolo D, Amiti S., Bossù T., Corradini C.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana "M. Aleandri"

La diffusione dell'acquariofilia ha registrato una crescita sostanziale negli ultimi decenni a livello mondiale, promuovendo il commercio di specie di pesci tropicali e di altri organismi acquatici tra i diversi continenti. Un aspetto spesso sottovalutato dell'aumento di questi scambi è rappresentato dal rischio di diffusione di numerosi ceppi batterici patogeni per l'uomo e per i pesci. Questi batteri sono spesso responsabili di infezioni subcliniche, difficilmente diagnosticabili ed evidenziabili da parte delle autorità doganali competenti e per questo difficilmente controllabili. Conseguenza dell'introduzione di batteri patogeni è la possibilità che rappresentino un fattore di rischio sanitario per le specie selvatiche autoctone e allevate e una fonte secondaria di infezione per gli esseri umani.

L'indagine preliminare da noi condotta ha avuto lo scopo di rilevare la presenza di batteri patogeni nell'area della vendita al dettaglio di pesci ornamentali di Roma e Viterbo (Italia), cercando di rilevare quali di questi sono maggiormente presenti e cercando di raccogliere maggiori informazioni sulla loro ecologia e attività patogena. In totale sono stati esaminati 22 pesci di diverse specie, 22 campioni d'acqua di trasporto e di stabulazione e 1 campione di lana filtrante da un acquario espositivo a lungo rimasto funzionante. Gli esemplari campionati erano stati importati dalla Repubblica Ceca e dal Sud-est Asiatico. Dopo esame necroscopico, da essi sono stati prelevati campioni di tessuto renale e cerebrale ed eventualmente di tessuti visibilmente interessati da processi patologici. I campioni sono stati seminati dapprima su Agar Sangue e Trypticase Soy Agar (arricchito di NaCl quando proveniente da animale marino). Le colonie sviluppate sono state poi inoculate su terreni colturali specifici per *Vibrio*, *Salmonella*, *Pseudomonas* e *Mycobacterium*. Le colonie ricavate sono state analizzate tramite l'ausilio del sistema automatico Vitek2®, test biochimici e colorazione Ziehl-Nielsen. In caso di positività alla colorazione suddetta, si è proceduto al sequenziamento della sub-unità *s16*.

Nonostante solo 3 pesci presentassero lesioni macroscopiche esterne (e quindi facilmente evidenziabili secondo le procedure routinarie di ispezione frontaliera), un totale di 15 pesci è risultato positivo alle prove batteriologiche. Tutti questi ultimi sono risultati positivi per *Aeromonas* spp. (in particolare le specie *hydrophila*, *veronii*, *sobria*), 3 per *Vibrio mimicus*, 1 per *Plesiomonas shigelloides* e 1 per *Lactococcus garviae*. La presenza di micobatteri è stata evidenziata in 4 casi, in uno di questi attraverso l'osservazione di lesioni granulomatose positive alla colorazione Ziehl-Nielsen e gli altri 3 tramite sequenziamento genetico. L'analisi batteriologica dei campioni d'acqua ha permesso il rilevamento in acqua di stabulazione di *Vibrio cholerae* non O1/O139, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*, *Aeromonas veronii*, *A. hydrophila* e spp., *Vibrio vulnificus* e spp.; in acqua di trasporto *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus gordonii*, *A. veronii* e *P. aeruginosa*. Nell'unico campione di lana filtrante seminato è stata evidenziata la presenza di batteri del genere *Clostridium*.

Il nostro studio conferma l'elevata prevalenza di agenti potenzialmente zoonotici nei pesci ornamentali importati e nell'acqua in cui essi vengono trasportati. L'analisi della storia anamnestica di alcuni acquari da noi esaminati ha permesso di osservare come alcuni batteri (come *Clostridium* e *Vibrio vulnificus*) permangano inosservati per molto tempo in acquari stabili da anni in cui non vengono immessi altri pesci. Gli enterobatteri rilevati in questo studio sono interessanti sia per gli aspetti di inquinamento ambientale che per la salute pubblica. *Edwardsiella tarda* è nota per far parte della normale flora intestinale delle specie ittiche e degli agenti di infezione negli esseri umani, ma anche per causare l'edwardsiellosi, malattia rilevante nel panorama produttivo ittico nazionale. Non è quindi escluso che l'eliminazione dell'acqua di trasporto da parte degli operatori (allevatori, commercianti e hobbisti) nelle acque di scarico possa significare una contaminazione ambientale potenzialmente pericolosa per le specie selvatiche autoctone o allevate.

VALUTAZIONE DELLE LESIONI GRANULOMATOSE DA BATTERI ACIDO-RESISTENTI IN SPIGOLE D'ALLEVAMENTO: UN PROBLEMA IGIENICO-SANITARIO EMERGENTE O RICORRENTE.

Natale S.¹, Carella F.², Capparucci F.¹, Iaria C.¹, Marino F.¹

¹Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Università di Messina (ME); ²Dipartimento di Biologia, Università degli studi di Napoli, Federico II (Na)

Il lavoro è stato condotto su milze di branzini (*Dicentrarchus labrax*) provenienti da un allevamento ittico del sud Italia al fine di analizzare le infezioni batteriche granulomatose nelle specie ittiche marine allevate e di studiarne l'eziologia e patogenesi, valutando le potenziali implicazioni per la salute pubblica. Tre esemplari di *D. labrax*, allevati in gabbie a terra, durante il mese di marzo 2019 mostravano mancanza di appetito e letargia, e dopo alcuni giorni decedevano spontaneamente. I soggetti sono stati prelevati e sottoposti ad attento esame anatomo-istopatologico, presso il Centro di Ittiopatologia Sperimentale della Sicilia (CISS). Macroscopicamente non si rilevavano lesioni degne di nota e l'esame citologico con colorazione Diff-Quik condotto su cute e branchie escludeva qualsiasi patologia di natura ectoparassitaria. In cavità celomatica è stato possibile osservare numerose lesioni nodulari di dimensioni variabili (0,5-2 mm) di colore bianco grigiastro a carico della milza, infiltranti il parenchima profondo. I campioni di milza sono stati fissati in formalina tamponata al 10% e colorati con ematossilina-eosina e Ziehl-Neelsen. L'esame istologico con ematossilina-eosina ha mostrato la presenza massiva di granulomi in diversi stadi evolutivi, con presenza di un centro eosinofilo necrotico, macrofagi e nella maggior parte dei casi una capsula periferica fibrosa spessa. La colorazione istochimica Ziehl-Neelsen ha mostrato la presenza di batteri fortemente marcati alcol-acido resistenti, sia all'interno dei granulomi che disseminati nel tessuto circostante. Nell'episodio sopra descritto, la presenza di un'elevata quantità di batteri bastoncellari acido-resistenti ha permesso di fornire una prova diagnostica della batteriosi sistemica, presumibilmente sostenuta da *Mycobacterium sp.* La verifica della suddetta eziologia confermerebbe la saltuaria ricomparsa sul territorio nazionale di tale agente zoonotico in specie ittiche allevate (Agnetti et al., 2005). Allo stesso tempo, data la gravità delle lesioni riscontrate e la massiccia presenza del batterio, risulta importante evidenziare il potenziale rischio di contagio per gli operatori del settore. E' attualmente in corso l'esame molecolare per l'identificazione della specie microbica.

Agnetti F., Zanoni R.G., Florio D., Latini M., Manuali E., Caffara M., Campo Dall'Orto B., Ghittino C., Fioravanti M.L. & Prearo M., Segnalazione di infezione da *Mycobacterium marinum* in spigole d'allevamento, Atti del XII Convegno Nazionale S.I.P.I., 29-30 Settembre – 1 Ottobre 2005, Cesenatico (FC), 23

RICERCA DI MICOBATTERI NON TUBERCOLARI IN POPOLAZIONI SELVATICHE DI SALMERINO DI FONTE (*SALVELINUS FONTINALIS*) IN AMBIENTI LACUSTRI DI ALTA QUOTA

Pastorino P.^{1,2}, Mugetti D.¹, Menconi V.¹, Esposito G.³, Pizzul E.², Prearo M.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; ²Dipartimento Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste, Trieste; ³Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari, Sassari.

I micobatteri non tubercolari (NTM) sono germi ubiquitari molto resistenti, presenti tanto in ambienti antropici, quanto in natura. L'acqua risulta una delle matrici più comuni in cui questi bacilli possono essere rinvenuti: pertanto non stupisce la loro presenza in ambienti fluviali e lacustri. In particolari condizioni, queste specie possono causare patologie negli organismi e, nello specifico, nei pesci: tali malattie sono note come micobatteriosi ittiche. I fattori predisponenti l'insorgenza di micobatteriosi nei pesci selvatici sono molteplici, tra cui condizioni stagionali, disponibilità e qualità di alimento, densità di popolazione ittica, parametri chimico-fisici dell'acqua e condizioni che possono causare stress nei pesci. Laghi e fiumi sono solitamente ambienti con densità ittiche esigue, caratteristica che rende più difficoltosa la diffusione di patologie: ciò si riflette anche sulla prevalenza di micobatteriosi ittiche in ambiente lacustre, che si attesta solitamente intorno al 2-4%. I laghi maggiormente indagati per lo studio di micobatteriosi ittiche sono quelli siti nella pianura padana e nella fascia prealpina: poco o nulla si sa su ambienti più marginali, quali i laghi dell'arco alpino.

Nel corso di un monitoraggio condotto durante il 2018 sui laghi della Balma (Coazze) sono stati analizzati 88 salmerini di fonte (*Salvelinus fontinalis*), 73 provenienti dal lago Sottano e 15 dal lago Soprano. Ogni soggetto è stato sottoposto alle analisi routinariamente svolte dal Laboratorio di Ittiopatologia dell'IZS di Torino (morfometrie, esami anatomopatologico, parassitologico, batteriologico, virologico); inoltre, in sede necroscopica, è stato prelevato il fegato per l'esame colturale per la ricerca di micobatteri non tubercolari. Una porzione del tessuto epatico è stata diluita in soluzione fisiologica, omogeneizzata in stomacher e decontaminata in soluzione acquosa all'1,5% di cetilpiridinio cloruro; il pellet ottenuto in seguito a centrifugazione è stato inoculato su terreni a base d'uovo, specifici per la crescita di micobatteri. Le colonie cresciute sono state saggiate alla colorazione di Ziehl-Neelsen e, in caso di positività, sottoposte ad estrazione di DNA e PCR genere specifica con target una porzione del gene *hsp65*. L'identificazione di specie è stata condotta sequenziando i prodotti di PCR e comparandoli con le sequenze presenti in banca dati.

L'esame anatomopatologico non ha evidenziato lesioni ascrivibili a micobatteriosi ittiche.

Al termine delle analisi colturali, tutti i salmerini del lago Sottano sono risultati negativi. Al contrario, il lago Soprano ha mostrato positività in 4 soggetti su 15 (26,7%); l'analisi biomolecolare ha permesso di identificare gli isolati come *Mycobacterium gordonae*. Di questi risultati non stupisce tanto la specie identificata (infatti, *M. gordonae* è una specie frequentemente isolata, anche se il suo ruolo patogeno è ancora dubbio), bensì le differenze nella distribuzione degli isolati tra i due laghi: si tratta infatti di ambienti poco distanti ed in comunicazione tra loro. L'alta prevalenza ottenuta nel lago Soprano è probabilmente imputabile anche all'esiguo numero di campioni analizzato: futuri prelievi saranno volti ad una valutazione maggiormente accurata della prevalenza di questo bacino.

Risulta comunque utile svolgere monitoraggi anche in questi ambienti poco conosciuti, per implementare i dati disponibili riguardo alla distribuzione e all'epidemiologia di micobatteri non tubercolari.

MONITORAGGIO DELLO STATO SANITARIO DI *PERCA FLUVIATILIS* NEL LAGO D'ISEO

Leveti S., Menconi V., Pastorino P., Mugetti D., Barbero R., Arsieni P., Saragaglia C., Prearo M.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino

Durante la stagione primaverile-estiva del 2019, numerosi pescatori, sia professionali che amatoriali, hanno segnalato una maggiore presenza di esemplari di pesce persico normalmente pescato con evidenti emorragie a livello cutaneo, rispetto alla norma; inoltre è stato da poco segnalato sulla stampa locale un episodio di mortalità occorso nella zona meridionale del lago, presso il comune di Paratico (BS). Nell'ambito del monitoraggio che è stato intrapreso per la valutazione dei parassiti zoonotici, si è voluto indagare anche sulla eventuale presenza di problematiche di tipo batterico nella popolazione di pesce persico normalmente oggetto di pesca.

Le positività che già il nostro laboratorio aveva evidenziato, erano riconducibili ad *Aeromonas salmonicida*, rinvenuta in pochi esemplari pescati durante la stagione tardo-primaverile di quest'anno. Le specie appartenenti al genere *Aeromonas*, sono bastoncelli anaerobi facoltativi, mobili e mesofili (*A. hydrophila*, *A. sobria*) ed immobili e psicrofili (*A. salmonicida*), non sporigeni, gram-negativi, ossidasi e catalasi positivi. La tassonomia del genere è in continua evoluzione e grazie alle tecniche di biologia molecolare, sono state apportate negli anni importanti revisioni. Le specie ascrivibili a questo genere di interesse ittico sono: *A. salmonicida*, *A. hydrophila* e *A. sobria*. Queste ultime sono specie ubiquitarie in ambiente acquatico, opportuniste in condizioni di stress e responsabili di patologie secondarie. *A. salmonicida* è invece un patogeno primario, che causa mortalità ed emorragie sistemiche. È considerato l'agente eziologico della foruncolosi che provoca gravi problemi nei pesci d'acqua dolce, in particolare nei salmonidi e nelle trote coltivate intensive. Sebbene la patogenesi delle infezioni da *Aeromonas* rimanga tutt'ora incerta, le specie possiedono numerosi fattori di virulenza che comprendono meccanismi di adesione e produzione di tossine. L'espressione dei fattori di virulenza sembra influenzata dalle condizioni ambientali e stagionali: oscillazione delle temperature, variazione del pH e della quantità di ossigeno disciolto in acqua.

Nel periodo estivo 2019 sono stati pescati dal Lago d'Iseo tramite pesca professionale, 306 esemplari di pesce persico (*Perca fluviatilis*); tutti i soggetti sono stati sottoposti ad un esame anatomopatologico e colturale su terreni di primo isolamento (Tryptic Soy Agar - TSA ed Agar Sangue - AS). Le piastre sono state incubate in termostato a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ per un massimo di 72 ore. Le colonie isolate sono state sottoposte alla colorazione di Gram, al test dell'ossidasi e di agglutinazione al lattice. Sono risultati positivi 261 esemplari (pari al 85,3%): l'identificazione biochimica è stata condotta su tutti gli isolati tramite gallerie API 20E ed API 20NE (bioMérieux) e confermata al MALDI-TOF. Dei 261 soggetti positivi, è stata isolata *A. salmonicida* in 202 esemplari, *A. hydrophila* in 27 soggetti, *Aeromonas* spp. in 19 pesci e germi non significativi nei restanti 13 esemplari. In base al mese di campionamento l'esame anatomopatologico dei pesci persico ha presentato quadri interessanti: in luglio i 166 soggetti esaminati non presentavano emorragie cutanee e muscolari, nonostante le positività all'esame colturale sono state rilevanti (136 esemplari positivi su 166 esaminati, pari all'81,9%, con 127 isolati di *A. salmonicida* e 5 di *A. hydrophila*), mentre in settembre sono apparse evidenti emorragie muscolari, epatiche e cutanee nella maggior parte dei pesci esaminati (140 pesci campionati di cui 125 positivi all'esame colturale, pari all'89,3%, con 75 isolati di *A. salmonicida*, 22 di *A. hydrophila*). Si è osservato pertanto un lieve aumento nella positività all'esame colturale tra i due campionamenti, mentre è risultato nettamente cambiato il quadro anatomopatologico nel campionamento di settembre, con evidenti manifestazioni cliniche.

Da questo studio preliminare, risulta significativo effettuare altri campionamenti per approfondire l'eventuale correlazione tra la presenza di segni clinici e la positività all'esame colturale, la verifica dell'associazione tra la stagionalità, la manifestazione dei sintomi e la presenza del microrganismo e la diffusione di *A. salmonicida* eventualmente in altre specie ittiche nel Lago d'Iseo.

IMPORTANZA DELLA PROFILASSI SULLE MALATTIE PARASSITARIE IN PESCI UTILIZZATI A FINI SPERIMENTALI

Menconi V.¹, Caimi C.², Pastorino P.¹, Barbero R.¹, Righetti M.¹, Levetti S.¹, Varello K.¹, Saragaglia C.¹, Perolo A.³, Ferrari A.¹, Gasco L.², Dondo A.¹, Prearo M.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; ²Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università degli Studi di Torino, Grugliasco (TO); ³Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione, Università degli Studi di Padova, Legnaro (PD).

L'utilizzo dei pesci come animali da sperimentazione negli ultimi decenni ha trovato un riscontro favorevole nella comunità scientifica, offrendo un'ampia gamma di applicazioni nel campo della ricerca. Durante la sperimentazione possono insorgere varie complicazioni di diversa natura, pertanto è necessario conoscere a fondo le esigenze fisiologiche e gli agenti eziologici della specie ittica utilizzata. Questo studio riporta due episodi di infestazione parassitaria in trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) utilizzate per prove nutrizionali: un'infezione sostenuta da protozoi flagellati ascrivibili al genere *Hexamita* e un caso di malattia nodulare branchiale riferibile alla presenza di amebe.

L'infestazione di *Hexamita* sp. a carico del lume intestinale è stata rilevata tramite osservazione microscopica a fresco. La presenza del parassita ha rapidamente determinato uno sfaldamento della mucosa intestinale con conseguente malassorbimento delle sostanze nutritive e grave dimagrimento degli animali infetti.

Nei pesci affetti da malattia nodulare branchiale l'esame microscopico a fresco ha evidenziato la massiva presenza di elementi rotondeggianti riferibili ad amebe. Le branchie mostravano una reazione proliferativa, con noduli osservabili anche a fresco ed ipermucosità diffusa principalmente agli apici delle lamelle. La presenza di amebe è stata confermata in seguito dall'esame istologico delle branchie.

In entrambi i casi riportati l'infestazione parassitaria ha causato la perdita di numerosi soggetti rendendo i risultati della prova sperimentale non attendibili. Infatti, l'insorgenza dei due episodi con parassitosi conclamata, hanno causato una mortalità dapprima subacuta (pochi soggetti deceduti) che in breve tempo si è trasformata in acuta (alta mortalità in un unico picco), colpendo più vasche dei diversi trattamenti, precludendo così l'esito finale della prova di alimentazione.

Le infestazioni parassitarie talvolta possono causare infezioni subcliniche e rimanere tali per lunghi periodi, rendendo difficili i controlli sanitari. La presenza di parassiti come conseguenza dell'introduzione di pesce da impianti di acquacoltura, rende indispensabile l'adozione di misure di quarantena prima di procedere alla sperimentazione. Per ridurre al minimo il rischio di introdurre nuovi agenti patogeni, i pesci dovrebbero essere acquistati da fonti affidabili che applicano un costante monitoraggio sanitario adeguatamente certificato. Le figure professionali coinvolte nella gestione sanitaria delle strutture di ricerca dovrebbero essere consapevoli dei potenziali patogeni emergenti che rappresentano un rischio non identificato. Un'efficace monitoraggio sanitario, permette il rilevamento degli agenti patogeni consentendo una rapida valutazione dei rischi e tutelando anche i programmi di ricerca. La segnalazione di nuovi agenti eziologici diffusi in pesci da sperimentazione contribuisce ad ampliare le conoscenze necessarie per elaborare strategie sanitarie più efficienti.

Questo studio mette in luce il potenziale impatto delle malattie parassitarie negli animali da sperimentazione e la necessità di prevenire importanti perdite economiche e migliorare il benessere degli animali utilizzati.

MONITORAGGIO DELL'INFESTAZIONE DA APOROCOTYLIDAE IN ORATE (*SPARUS AURATA*) ALLEVATE IN GABBIA IN LIGURIA

Gustinelli A.¹, Sirri R.¹, Yezza M.A.¹, Quaglio F.², Bruno G.³, Lavagna S.³, Fioravanti M.L.¹

¹Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Ozzano Emilia (BO);

²Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione, Università degli Studi di Padova, Padova; ³Piscicoltura Portovenere Società Agricola A.R.L., Gruppo Del Pesce, Portovenere (SP)

La famiglia Aporocotylidae annovera trematodi digenei che infestano diverse specie ittiche sia marine che di acqua dolce. Allo stadio adulto questi digenei si presentano di forma lanceolata, 1,5-2 mm di lunghezza, privi di ventose, e si localizzano a livello del sistema circolatorio. Le uova vengono eliminate dagli adulti nel circolo sanguigno e si localizzano in diversi organi interni ma soprattutto nelle branchie dove il miracidio schiude, perfora l'epitelio lamellare e fuoriesce nell'ambiente acquatico. Le branchie rappresentano quindi un importante organo target per la diagnosi delle infestazioni da Aporocotylidae mediante rilevamento della presenza delle uova di questi parassiti. Il miracidio trova poi come ospite intermedio un invertebrato bentonico, rappresentato da un anellide, in cui si trasforma in sporocisti da cui successivamente sono prodotte numerose cercarie; le cercarie escono poi dall'ospite intermedio e penetrano nell'ospite definitivo pesce dove diventano adulti all'interno dei vasi. Le infestazioni da Aporocotylidae sono state descritte per la prima volta nell'orata (*Sparus aurata*) in allevamenti in Spagna nel 2001. L'infestazione era associata a lesioni branchiali quali emorragie, trombi, moderata risposta infiammatoria e necrosi delle lamelle secondarie, determinata dalla localizzazione intravascolare delle uova che, se in numero elevato, sono in grado di causare occlusione dei vasi afferenti branchiali. Successivamente, nel 2008, Holtzer *et al.* hanno descritto e denominato *Cardicola aurata* la specie reperita nell'orata. Il presente studio intende illustrare i risultati di un monitoraggio sulle infestazioni da Aporocotylidae in orate allevate in gabbia in Italia. Nel periodo giugno-novembre 2018 sono state sottoposte ad esami parassitologici 141 orate di peso compreso tra 11,3 e 45,6g, campionate mensilmente da 4 gabbie di un allevamento ligure. Nel periodo di studio l'acqua ha presentato valori di temperatura compresi tra 17,6 e 26°C e di ossigeno tra 5,2 e 7 mg/l. Durante l'esame parassitologico veniva attribuito uno scoring (0-5) in base all'intensità d'infestazione rappresentata dal numero di uova di Aporocotylidae/arco branchiale osservato a fresco al microscopio ottico. Sono stati utilizzati test statistici non parametrici quali la correlazione di Spearman e il test di Kruskal-Wallis per l'analisi dei dati ottenuti. Le branchie e il cuore di alcuni soggetti sono stati fissati in formalina tamponata al 10% e le sezioni istologiche ottenute colorate con ematossilina-eosina. Inoltre, parallelamente, sono stati condotti campionamenti dal fondale marino al di sotto delle gabbie per effettuare la ricerca di stadi larvali di Aporocotylidae all'interno degli organismi bentonici reperiti. L'analisi statistica ha evidenziato una correlazione positiva e significativa tra lo scoring dell'intensità d'infezione ed il peso medio dei soggetti ($R = 0,67$; $p = 2,2E-16$). Il test di Kruskal-Wallis ha mostrato differenze statisticamente significative dell'intensità d'infestazione in relazione a temperatura, ossigeno disciolto e peso medio dei soggetti ($p < 0,05$). All'istologia si osservavano all'interno dei vasi afferenti delle lamelle primarie e secondarie numerose uova di dimensioni di circa 30 micron, con parete eosinofila ben visibile, che occludevano il lume vasale. I tessuti delle lamelle secondarie circostanti alle uova presentavano grave iperplasia epiteliale con fusione delle lamelle, necrosi e abbondante infiltrato infiammatorio costituito da linfociti, macrofagi e mastociti. Non si è rilevata la presenza di adulti di Aporocotylidae a livello delle arterie branchiali afferenti o a livello cardiaco. In numerose orate è stata registrata la presenza concomitante di altri parassiti branchiali quali *Sparicotyle chrysophrii* e *Furnestinia echeneis*, la cui correlazione con la presenza di Aporocotylidae e con la presenza di anemia branchiale rilevata in numerosi esemplari è in studio. Non sono stati rilevati stadi larvali riferibili ad Aporocotylidae negli organismi bentonici campionati dal fondale marino. Alla luce dell'importanza sanitaria delle infestazioni da Aporocotylidae nell'orata appaiono urgenti studi volti a chiarirne il ciclo biologico e l'epidemiologia.

LOCALIZZAZIONE ATIPICA DI *PENNELLA* SPP.: NUOVI RITROVAMENTI IN CUORI DI PESCE SPADA

Mugetti D.¹, Menconi V.¹, Mignone W.¹, Garibaldi F.², Chiappino L.³, Sereno A.³, Capucchio M.T.^{3,4}, Guarda F.³

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; ²Dipartimento di Scienze della Terra, dell'Ambiente e della Vita, Università degli Studi di Genova; ³Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino, Grugliasco (TO); ⁴ISPA CNR, Grugliasco (Torino).

Al genere *Pennella* Oken, 1816 (Copepoda, Pennellidae) afferiscono 9 specie attualmente riconosciute di mesoparassiti copepodi in grado di infestare cefalopodi, pesci e mammiferi marini. Il ciclo biologico di questi parassiti è poco conosciuto: nonostante ciò, sembra che le femmine di *Pennella* spp. possiedano un'elevata specificità d'ospite, infestando non più di 1-2 specie animali. Da questa affermazione si discostano due specie: *P. filosa*, segnalata in diversi osteitti marini tra cui pesce luna (*Mola mola*), pesce spada (*Xiphias gladius*) e varie specie di tonno (*Thunnus* spp.) e *P. balaenopterae*, di cui si registrano casi in balene, delfini, focene e, occasionalmente, pinnipedi.

Il differenziamento tra le due specie di parassiti è basato sui caratteri morfologici nelle femmine adulte. Come detto, il pesce spada è segnalato quale specie parassitata da questo genere di copepodi. L'ultima segnalazione, ad opera di Gustinelli *et al.* (2018), ha riguardato un singolo caso di pesce spada in cui è stata rinvenuta *Pennella* spp. con parziale localizzazione cardiaca. Questo lavoro ha lo scopo di confermare ed implementare la casistica di infestazioni di parassiti del genere *Pennella* rinvenuti in cuori di pesce spada pescati nel mar Ligure.

Sono stati analizzati 82 cuori di pesce spada pescati durante il 2018. In sede di eviscerazione, il cuore è stato congelato per il trasporto e successivamente fissato in formalina tamponata al 10% per l'esecuzione dell'esame istologico. Le colorazioni eseguite sulle sezioni ricavate sono state Ematossilina – Eosina, Weigert Van Gieson, PAS-Alcian e Blu di Toluidina.

In seguito all'esame visivo esterno è stato possibile rinvenire copepodi asseribili morfologicamente al genere *Pennella* in 9 esemplari (P=10,9%) di pesce spada. L'identificazione morfologica di specie non è stata possibile, in quanto sono state isolate unicamente porzioni del parassita. I cuori parassitati presentavano pericardite fibrinosa cronica a diverso stadio (lieve, media, grave), atrofia gelatinosa del grasso (1 caso), alterazioni valvolari (3 casi) e varie lesioni a carico dell'atrio (ispessimento ed indurimento della parete, coaguli di sangue fermamente adeso, necrosi). L'esame istologico ha permesso di evidenziare strutture parassitarie all'interno dei cuori, oltre a confermare le lesioni precedentemente osservate. Nella quasi totalità dei casi (8 casi), i parassiti localizzati nella parete dell'atrio hanno provocato alterazioni flogistico-necrotiche ad evoluzione cronica con formazione di una reazione granulomatosa che circondava gli stessi. Invece, nell'unica localizzazione ventricolare, il parassita era circondato esclusivamente da una demarcazione flogistica.

Restano ancora da chiarire molti aspetti riguardo le infestazioni, il ciclo biologico e gli aspetti epidemiologici di parassiti del genere *Pennella* nei pesci marini. Sicuramente questi copepodi rappresentano un problema per la vendita del pesce pescato e i casi durante le ispezioni veterinarie nei mercati ittici non sono esigui: nonostante ciò, i lavori presenti nella letteratura scientifica sono scarsi. Futuri campionamenti potranno essere utili per l'identificazione di specie mediante metodiche biomolecolari, per far luce sullo spettro d'ospite di crostacei copepodi parassiti.

Il pesce spada, in cui sono già stati segnalati casi di infestazioni causate da *P. filosa* e *P. instructa*, è una pregiata specie marina pescata nei nostri mari: la presenza di questi parassiti rappresenta quindi un problema, oltre che per la salute di questi pesci, anche per il danno economico che consegue all'infestazione.

INDAGINE PRELIMINARE SULL'ELMINTOFAUNA DI CERNIE BRUNE (*EPINEPHELUS MARGINATUS*)

De Benedetto G.¹, Morello D.¹, Arfuso F.¹, Iaria C.², Marino F.², Gaglio G.¹

¹Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Messina; ²Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche e Ambientali, Università degli Studi di Messina.

La cernia bruna (*Epinephelus marginatus*) è un pesce proteroginico, di grandi dimensioni, le cui carni sono notevolmente apprezzate dal consumatore. Nonostante l'elevato valore economico di questa specie ittica, sono pochi gli studi sulla sua fauna parassitaria, fatta eccezione per alcuni indagini focalizzate su parassiti branchiali e gonadici.

Alla luce di tali considerazioni, lo scopo della presente indagine è stato quello di investigare la fauna parassitaria in esemplari selvatici di *E. marginatus* pescati nelle acque siciliane.

Lo studio è stato condotto su 36 esemplari pescati nel Mediterraneo centrale (area FAO 37.2), e campionati presso rivenditori e mercati ittici delle province di Messina e Siracusa da maggio 2018 ad agosto 2019. Tutti i soggetti (con un peso e lunghezza totale che variavano da 280 g a 8 kg e da 18 a 80 cm, rispettivamente) sono stati processati utilizzando le classiche tecniche parassitologiche.

In totale, 21 cernie su 36 analizzate (58.3%) sono risultate positive all'indagine parassitologica. Il distretto maggiormente parassitato è risultato l'intestino, seguito da branchie, stomaco, gonadi e sierosa intestinale. Soltanto un esemplare di cernia risultava infestata da una singola specie parassitaria.

A livello intestinale sono stati isolati il trematode *Proisorhynchus caudovatus* e nematodi adulti identificati come *Hysterothylacium*. Nelle branchie sono stati repertati didimozoidi appartenenti alla specie *Gonapodasmius epinepheli* e il trematode monogeneo *Pseudempleurosoma* sp. in un unico esemplare. A livello gastrico oltre al digeneo *P. caudovatus* sono state isolate larve di *Anisakis* type II. Le gonadi di quattro cernie risultavano infestate dal nematode *Philometra jordanoi*. Un solo esemplare presentava sulla sierosa intestinale forme immature di acantocefali.

La presente indagine rappresenta il primo studio completo sulla fauna parassitaria di *E. marginatus* nel Mar Mediterraneo. L'indagine condotta sugli esemplari pescati nelle acque siciliane, ha consentito di descrivere la presenza di sette specie di parassiti caratterizzate da bassi valori di Prevalenza, Abbondanza media e Intensità media; questo risultato ci spinge a definire la cernia bruna presente in quest'area del Mediterraneo come una specie "povera" in parassiti. La presenza di specie parassitarie ospite-specifiche rinvenute negli esemplari studiati, conferma che, dal punto di vista ecologico, questa specie ittica sia ben confinata nel proprio habitat, e che tenda ad utilizzare sempre le stesse fonti trofiche. L'indagine parassitologica condotta nel nostro studio ha consentito di aggiungere qualche tassello alle conoscenze sulla fauna parassitaria di questi serranidi nell'area mediterranea, segnalando per la prima volta in *E. marginatus* i parassiti *P. caudovatus*, *Pseudempleurosoma* sp., *Hysterothylacium* sp. e acantocefali. Ad eccezione delle alterazioni gonadiche conseguenti alla presenza di nematodi philometridi, non sono state riscontrate lesioni macroscopiche attribuibili ad agenti parassitari.

In conclusione, i risultati ottenuti suggeriscono che le poche specie parassitarie isolate dagli esemplari di *E. marginatus* non rappresentano un importante problema di Sanità Pubblica e risultano in perfetto equilibrio con la popolazione ospite.

RECENTI FOCOLAI DI MALATTIA NODULARE BRANCHIALE IN ALCUNE TROTTICOLTURE UMBRO-MARCHIGIANE

Agnetti F.¹, Ciavarella R.¹, Epifanio E.M.¹, Rogato F.², Valentini A.¹, Zamparo S.³, Ghittino C.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati", Terni; ²Skretting Italia S.p.a., Frazione San Zeno, Mozzecane (VR); ³Scuola di Specializzazione in AIPSA "D. Lanari", Università degli Studi di Udine, Udine

La malattia nodulare branchiale (NGD) associata alla presenza di organismi ameba-like è una patologia che colpisce i salmonidi di acqua dolce allevati, in particolare trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) e salmerino (*Salvelinus fontinalis*, *S. alpinus*), segnalata in Nord-America ed Europa, Italia compresa (Quaglio *et al.*, 2016, Perolo *et al.*, 2019). L'insorgenza della malattia, prevalentemente nella stagione invernale, è favorita da fattori predisponenti, quali l'elevata densità in vasca, la forzatura alimentare, i sempre più evidenti cambiamenti climatici, la scarsa igiene ambientale ed errori di management. Dal punto di vista macroscopico la NGD consta in una proliferazione nodulare a carico delle porzioni distali dei filamenti branchiali, variabile da focale a coinvolgente tutto l'arco branchiale; istologicamente tale quadro corrisponde ad una iperplasia dell'epitelio delle lamelle branchiali (Perolo *et al.*, 2019). Le conoscenze riguardo la prevalenza della malattia, la sua distribuzione geografica e la patogenesi correlata alle condizioni ambientali predisponenti non sono comunque tuttora definite. Ad oggi in Italia la NGD rappresenta una malattia potenzialmente in grado di causare danni economici alle trotticoltura e necessita particolare attenzione ed ulteriori studi di approfondimento. Scopo del lavoro è quello di descrivere dei recenti focolai di NGD in alcune trotticoltura umbro-marchigiane. Da aprile a luglio 2019 sono stati esaminati esemplari di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) e fario (*Salmo trutta fario*) di taglia compresa tra 1/5g-40/45g, allevate in alcuni impianti lungo il corso del fiume Nera (regioni Umbria e Marche), con acqua sorgiva superficiale alla temperatura costante di 12-15°C. Le trote osservate mostravano atteggiamenti di sofferenza respiratoria (dilatazione opercolare e respirazione in superficie) ed i tassi di mortalità si aggiravano intorno al 20-30%; una volta catturate e portate in laboratorio entro le 24 ore in condizioni di refrigerazione, sono state sottoposte ad esame necroscopico e a successive indagini di laboratorio (esame microscopico a fresco e colorato delle branchie, esami batteriologici e virologici per le principali patologie infettive dei salmonidi). Alcuni campioni di branchie sono stati inoltre destinati ad esame istologico, previa fissazione in formalina neutra tamponata al 10%, inclusione in paraffina, colorazione con Ematossilina-Eosina (E-E) e Giemsa e valutazione secondo la classificazione di Clark & Novak (1999). Alla necropsia tutti i soggetti analizzati hanno mostrato un esclusivo quadro respiratorio, con evidenti rilievi macroscopici di malattia branchiale. L'esame microscopico delle branchie ha mostrato quadri variabili da lieve edema/fusione fino a degenerazione/necrosi lamellare, con presenza di numerose formazioni rotondeggianti, di dimensioni all'incirca di 15x25µm, riferibili ad amebe. L'esame istologico ha messo in evidenza quadri di gravità variabile da grado 2 a 4 (da iperplasia delle lamelle di circa metà di un singolo filamento branchiale fino ad iperplasia reattiva di più della metà della lunghezza di tutti i filamenti branchiali); inoltre, in alcuni esemplari, sono stati individuati microrganismi unicellulari morfologicamente riferibili ad amebe, incistati nei filamenti e/o disposti lungo la superficie lamellare. Gli esami batteriologici e virologici sono risultati negativi. Dal punto di vista clinico, un progressivo miglioramento della sintomatologia, e quindi del tasso di mortalità, si è avuto con l'utilizzo di trattamenti ambientali a base di Sali quaternari d'ammonio. I dati riscontrati, seppur non rappresentativi di tutto il contesto zootecnico umbro-marchigiano, contribuiscono a definire la NGD come patologia da monitorare nelle trotticoltura nazionali, richiedendo una sempre maggiore attenzione da parte degli operatori del settore ed un sempre costante rispetto delle buone pratiche di allevamento, onde abbattere il rischio di diffusione e proliferazione di tali patogeni e prevenire quindi la necessità di intervento terapeutico.

Clark A., Nowak B.F. (1999). Field investigations of amoebic gill disease in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Tasmania. *Journal of Fish Diseases*, 22, 433-443.

Perolo A., Gustinelli A., Fioravanti M.L., Manfrin A., Dalla Pozza M., Lunelli F., Accini A., Quaglio F. (2019) Occurrence of nodular gill disease in farmed brown trout (*Salmo trutta* L.). *Journal of Fish Diseases*, 42: 1315-1320.

Quaglio F., Perolo A., Bronzatti P., Gustinelli A., Menconi V., Cavazza G., Fioravanti M.L. (2016). Nodular gill disease in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Italy. *Journal of Fish Diseases*, 39, 1139-1142.

INDAGINE SULLA PATOGENESI DELLA MALATTIA NODULARE BRANCHIALE NELLA TROTA IRIDEA (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)

Perolo A.¹, Dalla Pozza M.², Toson M.², Gustinelli A.³, Fioravanti M.L.³, Quaglio F.¹

¹Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione, Università degli Studi di Padova, Legnaro (PD); ²Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD); ³Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum, Università di Bologna, Ozzano Emilia (BO)

La Malattia Nodulare Branchiale (NGD) rappresenta una delle principali patologie respiratorie emergenti dei salmonidi allevati in acqua dolce causata da amebe. Scarse sono le conoscenze sull'insorgenza, l'evoluzione ed il decorso della NGD. Data l'importanza della patologia in Italia, sono stati intrapresi studi volti ad approfondirne la patogenesi.

Le indagini sono state condotte in cinque allevamenti di trota iridea, interessati periodicamente da episodi di NGD. Tre trotecolture sono state monitorate da luglio 2016 a maggio 2017, due nello stesso periodo nel corso del 2018. In ogni allevamento è stata monitorata una vasca da ingrasso con trascorsi episodi di NGD a partire dall'immissione di trotelle sane (10-15g). Sono stati effettuati 2 campionamenti al mese. Durante il campionamento venivano monitorati i principali parametri delle acque (T°, O₂ e pH), la gravità della sintomatologia respiratoria dei pesci in vasca, la mortalità giornaliera. In ogni campionamento venivano prelevati 10 pesci, cinque a metà vasca e cinque a ridosso delle griglie di scarico, per un totale complessivo di 220 trote per allevamento. I campioni venivano sottoposti ad analisi necroscopiche, microscopiche ed istologiche. La gravità delle lesioni proliferative istologiche ed il numero di amebe presenti per arco branchiale sono stati valutati con una classificazione compresa tra 0 e 5, secondo le metodiche (modificate) descritte da Taylor *et al.* (2009) e Clark *et al.* (1997) per Amoebic Gill Disease del salmone atlantico.

Le successive analisi ed elaborazioni statistiche dei dati raccolti sono state eseguite presso l'IZSVe. Per comparare le lesioni istologiche ed il numero di amebe osservate nei mesi primaverili/estivi e quelli dei mesi autunnali/invernali è stata determinata la variabile "stagione", suddivisa in stagione estiva (aprile-settembre) ed invernale (settembre-aprile). Per il confronto è stato usato il test non parametrico di Wilcoxon-Mann-Whitney, seguito dal test di Levene che valuta la omoschedasticità dei gruppi. Per valutare la correlazione fra il numero di amebe e il numero di lesioni istologiche (variabili quantitative) è stato calcolato il coefficiente non parametrico di Spearman Rho_s.

Dal monitoraggio delle cinque vasche è emerso che tutte le trotecolture manifestavano i primi sintomi respiratori ad inizio autunno, associati a mortalità, lesioni branchiali e presenza di amebe. Gli episodi di NGD raggiungevano la gravità massima nelle ultime settimane autunnali o ad inizio inverno per poi mantenersi su livelli elevati per tutta la stagione fredda, diminuendo in tarda primavera. Le analisi statistiche sulla stagionalità della malattia hanno mostrato una differenza significativa fra la gravità delle lesioni branchiali ed il numero di amebe osservate durante la stagione autunnale-invernale e quelle rilevate in primavera ed estate (per entrambe le variabili Test di Levene: p-value>0,05; test di Wilcoxon-Mann-Whitney: p-value=0,0000). La gravità delle lesioni, valutata all'esame istologico risultava significativamente più elevata durante la stagione fredda rispetto ai mesi primaverili-estivi (mediane 2,7 vs 0,4), allo stesso modo il numero di amebe risultava significativamente più elevato durante i mesi autunnali-invernali rispetto a quanto osservato durante l'estate (mediane: 2,2 vs 0).

Dall'esito di questi esami si può considerare la NGD, in Italia, come una patologia stagionale prettamente autunnale-invernale. L'analisi effettuata sulle lesioni branchiali e numero di amebe presenti, applicando il Coefficiente Rho, ha rivelato una correlazione positiva molto forte fra questi parametri (Rho>0,8), ciò significava che ad un maggior numero di parassiti presenti corrispondeva una maggiore gravità delle lesioni iperplastico-proliferative dell'epitelio branchiale.

Le analisi statistiche evidenziano nelle amebe un ruolo da patogeno primario, in grado di indurre NGD per interazione diretta. Ulteriori studi sono in corso per la tipizzazione dell'agente eziologico.

RISCONTRO DI *PSEUDOCAPILLARIA TOMENTOSA* IN ZEBRAFISH PROVENIENTI DA ESERCIZI COMMERCIALI

Capparucci F.¹, De Benedetto G.², Iaria C.¹, Natale S.¹, Gaglio G.², Marino F.¹

¹Dip. di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, ²Università degli Studi di Messina, Via S. d'Alcontres 31, 98166 Messina

Il presente lavoro nasce con l'obiettivo di effettuare un'indagine igienico-sanitaria condotto su esemplari di *Danio rerio* provenienti da rivenditori di pesci ornamentali. 50 soggetti sono stati acquisiti da un importatore locale e sacrificati per valutarne le eventuali patologie. Sui campioni sono stati effettuati esami citologici (Diff-Quik) ed esami istologici con Ematossilina-Eosina, Giemsa, PAS e Tricromica di Mallory. L'esame parassitologico a fresco risultava negativo, in quanto non si evidenziava alcuna presenza di parassiti a livello cutaneo e branchiale; inoltre, dall'esame citologico Diff-Quik effettuato sui medesimi organi, non emergevano forme batteriche, micotiche e parassitarie. All'esame istologico (H&E) non si evidenziavano alterazioni parenchimatose a carico degli organi celomatici. In tre esemplari, a livello gastroenterico è stato possibile evidenziare la presenza di un'infestazione massiva da parassiti filiformi, variabili in lunghezza (4-6 mm), sia liberi nel lume intestinale che raramente adesi alla mucosa; inoltre, a causa dell'elevato grado di infestazione, era possibile evidenziare una lieve riduzione di lunghezza dei villi intestinali. Dalle caratteristiche morfologiche, in accordo con Moravec (1995), possiamo affermare che l'infestazione sia attribuibile alla specie *Pseudocapillaria tomentosa*. Le infezioni intestinali causate dal nematode *P. tomentosa* sono solitamente riscontrate con frequenza, ma con bassa prevalenza, negli stabulari rispetto ad altre patologie a diversa eziologia, rappresentando ancora una criticità a causa dell'alto tasso di mortalità indotta dall'infestazione. Ai fini della sperimentazione, *D. rerio*, la specie ittica diffusamente più utilizzata, deve provenire da stabilimenti fornitori autorizzati (All. 1 26/2014) e non da esercizi commerciali. Ciò al fine di evitare la trasmissione di diversi agenti patogeni, tra cui *P. tomentosa*, e mettere a rischio la qualità dei risultati della sperimentazione. L'utilizzo dello zebrafish, per scopi ornamentali e sperimentali, ha portato la comunità scientifica a prestare attenzione allo sviluppo della gestione della produzione di zebrafish e della stabulazione a fini sperimentali, che richiedono un'adeguata formazione degli operatori, nonché accurati e periodici controlli igienico-sanitari, al fine di evitare contaminazioni che potrebbero ripercuotersi sulla salute dei pesci da laboratorio e garantire pertanto la qualità degli animali prodotti/utilizzati, nonché la qualità degli esperimenti. I risultati ottenuti sono in linea con la letteratura in riferimento alla prevalenza e supportano ulteriormente la scelta del legislatore di imporre la provenienza da stabilimenti fornitori autorizzati.

STUDIO PRELIMINARE DEI CASI DI MORTALITA' DI RICCI (*PARACENTROTUS LIVIDUS*) IN CAMPANIA E SARDEGNA: LA *BALD DISEASE*

Carella F.¹, Farina S.², Miele C.¹, Guala I.¹, Grech D.², Zupo V.³, De Vico G.¹

¹Dipartimento di Biologia, Università degli studi di Napoli, Federico II ; ²IMC International Marine Centre, Torregrande, 09170 Oristano, Italy, ³SZN, Stazione zoologica Anton Dohrn, Naples

Una delle conseguenze più evidenti del riscaldamento delle acque a livello globale è l'aumentata incidenza di malattie negli organismi acquatici. Negli ultimi anni si è assistito ad un aumento dei casi di mortalità di ricci di mare appartenenti a diverse specie. Ad oggi, la malattia è stata descritta in 19 specie di echinoidi, sia in ambiente naturale che in acquacoltura. Le basi eziopatogenetiche di tali eventi sono note solo per alcune delle specie, in cui sono stati descritti diversi agenti patogeni di natura batterica. La manifestazione della malattia è talora rappresentata dalla perdita degli aculei, presenza di materiale amorfo in prossimità dei pedicelli ambulacrali, fino ad arrivare all'erosione e perdita di parti dell'esoscheletro. Tali sintomi, riportati genericamente come *bald disease* ovvero la malattia del riccio calvo, sono stati descritti per la prima volta nella specie *Strongylocentrotus franciscanus* nel 1970 lungo la costa californiana degli Stati Uniti. Alla fine degli anni '70, vengono poi segnalate gravi epidemie che colpiscono diverse specie di echinoidi nel Mar Mediterraneo. In questo studio riportiamo le lesioni macro-microscopiche di ricci di mare (*Paracentrotus lividus*) (Lamarck 1816) in Campania e in Sardegna nella Primavera del 2019. La maggioranza delle lesioni riscontrate si riferiscono a processi infiammatori e necrotici a livello dei pedicelli ambulacrali e dell'apparato digerente. Ulteriori studi sono in corso per meglio definire gli aspetti eziopatogenetici delle lesioni osservate.

VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI GENI DSCAM (*DOWN SYNDROME CELL ADHESION MOLECULE*) IN GIOVANILI DI *CRASSOSTREA GIGAS* ESPOSTI A INFEZIONE DA OSHV-1 A DIFFERENTI TEMPERATURE

Carella F.¹, Aceto S.¹, Bellot O.², Bertomeu E.², Gras N.², Gairin I.², Andree K.B.², Furones D.², De Vico G.¹, Carrasco N.²

¹Dipartimento di Biologia, Università degli studi di Napoli, Federico II; ²IRTA-Sant Carles de la Ràpita, Tarragona, Spain

La continua crescita dell'acquacoltura di molluschi e crostacei in tutto il mondo e i relativi problemi inerenti la diffusione di epidemie, hanno spinto la ricerca scientifica degli ultimi anni ad approfondire gli studi sul sistema immunitario degli invertebrati. Il sistema immunitario viene classicamente suddiviso in due sottosistemi: risposte immunitarie innate, che reagiscono rapidamente e in modo non specifico all'incontro con un patogeno, e risposte immunitarie adattive, che sono più lente a svilupparsi ma sono specifiche (dovute a riarrangiamenti del gene per il recettore antigenico) e danno luogo alla classica memoria immunologica. Le immunoglobuline (Ig), parte integrante di tale risposta specifica dei vertebrati, sono i recettori di superficie che svolgono importanti funzioni di riconoscimento antigenico specifico. Fino a poco tempo fa si riteneva che le risposte difensive degli invertebrati contassero su una limitata e aspecifica diversità molecolare. Di recente, numerose evidenze scientifiche hanno suggerito che gli invertebrati sono capaci di una risposta immunitaria specifica e altamente discriminatoria, costituita in parte da un sistema di geni ipervariabili. In tale contesto, la molecola di adesione cellulare *Dscam* (*Down syndrome cell adhesion molecule*), appartenente alla super famiglia delle immunoglobuline, inizialmente descritta nel sistema nervoso dell'uomo e in altri animali, si è scoperto essere parte integrante del sistema immunitario degli artropodi, con centinaia di differenti isoforme prodotte, capaci di legare una vasta gamma di antigeni di diversa natura. Trascritti di *Dscam* sono stati riportati in molluschi bivalvi come *Saccostrea glomerata*, *Mytilus edulis* e *Crassostrea gigas*, tuttavia non sono presenti informazioni circa il suo ruolo e la sua espressione in caso di infezione. Nel contesto del progetto europeo *VIVALDI Horizon 2020 (Preventing and Mitigating Farmed Bivalve Diseases)* sono state condotte infezioni sperimentali su giovanili (~2-3cm) di *Crassostrea gigas* per 20 giorni con herpes virus *OsHV-1* a tre diverse condizioni di temperatura (16, 23 e 25° C). Sono state caratterizzate e isolate due isoforme di *CgDscam*, ne è stata studiata l'espressione genica alle diverse condizioni sperimentali in rapporto all'intensità d'infezione. Le due isoforme *CgDscam* hanno mostrato livelli di espressione più alti rispetto ai controlli, anche correlati all'intensità d'infezione, con diminuzione nei giorni post-infezione. E' stato inoltre testato, tramite esame immunoistochimico, un anticorpo *CgDscam* sui tessuti infetti degli stessi animali. I risultati ottenuti suggeriscono un coinvolgimento di *Dscam* nelle risposte immunitarie in corso di infezione virale dei molluschi bivalvi, aprendo interessanti prospettive di studio nel campo dell'immunologia comparata.

STUDIO SULLA PRESENZA DEL PROTOZOO *MARTEILIA REFRINGENS* IN ALLEVAMENTI CAMPANI CON RELATIVI IMPATTI ECOLOGICI E ZOOTECNICI

Carella F.¹, Aceto S.¹, Villari G.¹, Iaccarino D.², Maresca F.¹, Lucibelli G.², De Vico G.¹, Di Nocera F.²

¹Dipartimento di Biologia, Università degli studi di Napoli, Federico II; ²Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, 80055 Portici

Il genere *Marteilia*, phylum Paramyxia, raggruppa protisti parassiti che colpiscono diverse specie di bivalvi di interesse commerciale. Tale gruppo di parassiti è presente in diverse aree geografiche con conseguente forte impatto socio-economico ed ecologico. La martellosi causata da *Marteilia refringens* è stata inclusa nella lista dell'OIE ed è stata inoltre trattata dall'Unione Europea all'interno della Direttiva 2006/88/EC che è stata recepita in Italia dal D. Lgs. 148/2008. Questo parassita in precedenza comprendeva due specie, *M. refringens* e *Marteilia maurini* successivamente denominate *M. refringens* "O-type" e "M-type". Il tipo O ha causato mortalità di massa dell'ostrica piatta *Ostrea edulis* mentre il tipo M è responsabile delle parassitosi in *M. galloprovincialis*. Recenti studi genetici definiscono i due sotto tipi come due specie separate: *M. refringens* (Tipo O) e *Marteilia pararefringens* sp. (Tipo M).

Nel contesto del Progetto della Ricerca Corrente IZS 2016, allo scopo di definire la distribuzione della Martellosi nella Regione Campania, la specie di *Marteilia* presente, gli effetti sull'ospite e eventuali ospiti intermedi, campioni di mitili (*M. galloprovincialis*) sono stati prelevati da Maggio a Luglio 2018 in 6 allevamenti del litorale campano compresi fra l'area flegrea e l'area vesuviana: Capo Miseno, Lucrino, Castel dell'Ovo, Torre del Greco, Torre Annunziata, Ercolano. Per ogni sito sono stati misurati parametri abiotici tramite sonda multi-parametrica: temperatura, salinità, concentrazione di ossigeno disciolto. Al campionamento, i bivalvi (n=30) sono stati pesati per la valutazione degli indici di condizione (IC), e sottoposti ad esame esterno, esame citologico, istopatologico e molecolare (PCR, qPCR, ISH -in situ hybridization). La definizione della specie di *Marteilia* è stata effettuata utilizzando di qPCR che utilizza sonde Taqman MareO.p01 secondo Carrasco *et al.*, 2017.

Da una prima analisi degli indici di condizione dei mitili esaminati, i valori più bassi si sono registrati nelle zone di Capo Miseno, Lucrino e Torre Annunziata. All'esame istopatologico, differenti fasi di sviluppo del patogeno *Marteilia* sono stati registrati nei campioni di Lucrino di Maggio 2018 (15%) e Torre Annunziata Maggio e Luglio 2018 (20%), in taluni casi correlati con danni all'apparato digerente macroscopicamente visibili. A Torre Annunziata sono state osservate principalmente fasi di sviluppo iniziali, con scarsi fenomeni di sporulazione. In generale, all'esame istopatologico, la presenza del patogeno era associata a lesioni di natura infiammatoria di tipo infiltrativo, più o meno forti, con fenomeni rigenerativi degli epiteli ghiandolari e presenza di secrezioni acide. Di fatto, negli animali infetti si è registrato una diminuzione degli IC pari a circa il 15-20% in peso rispetto agli individui non infetti in rapporto alla fase di sviluppo e la diffusione nei tessuti. Altri studi sono in corso allo scopo di definire la dinamica e l'effetto di questa malattia nelle acque campane.

Carrasco N, Voorbergen-Laarman M, Lacuesta B, Furones D, Engelsma M (2017). Application of a competitive real time PCR for detection of *Marteilia refringens* genotype "O" and "M" in two geographical locations: The Ebro Delta, Spain and the Rhine-Meuse Delta, the Netherlands. J Invertebr Pathol. 2017 Oct; 149:51-55. doi: 10.1016/j.jip.2017.07.004

STUDIO SULLA PRESENZA DI *APHANOMYCES ASTACI* (OOMYCETES, LEPTOLEGNIACEAE) IN POPOLAZIONI DI GAMBERI DULCIACQUICOLI DELL'ITALIA SETTENTRIONALE

Tomasoni M.¹, Gustinelli A.¹, Fioravanti M.L.¹, Tosi F.², Quaglio F.³, Fea G.⁴, Ghia D.⁴, Pretto T.²

¹Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum Università di Bologna; ²Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie; ³Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione, Università di Padova; ⁴Dipartimento di Scienze della Terra e dell'Ambiente dell'Università degli Studi di Pavia

Aphanomyces astaci, oomicete appartenente all'ordine Saprolegniales, è l'agente eziologico della "peste del gambero", malattia ad elevata contagiosità in grado di determinare nelle popolazioni di gamberi autoctoni d'acqua dolce gravissimi episodi di mortalità. Portatori asintomatici di *A. astaci* sono i gamberi dulciacquicoli del Nord America (*Pacifastacus leniusculus*, *Procambarus clarkii*, *Orconectes limosus*, ecc), in particolare il gambero della Louisiana *P. clarkii*, la cui introduzione a scopo di allevamento ed ornamentale è ritenuta responsabile della diffusione della malattia nelle popolazioni autoctone dell'Europa meridionale, contribuendo in larga misura alla loro diminuzione in natura. Nonostante l'importanza sanitaria di questa malattia, il reale impatto a livello nazionale resta ancora difficile da stabilire per la scarsità di dati a disposizione sugli episodi di mortalità massiva attribuibili ad *A. astaci*. Scopo del presente lavoro è stato quello di verificare la presenza di *A. astaci* in gamberi autoctoni ed alloctoni presenti nell'area del Parco Regionale di Montevicchio e della Valle del Curone (LC), nel quale nel 2011 si era verificata una moria riferibile a peste del gambero. La ricerca ha avuto come oggetto il gambero di fiume *Austropotamobius pallipes* complex (specie autoctona) ed il gambero rosso della Louisiana *P. clarkii* (specie alloctona). Sono stati campionati 29 esemplari di *A. pallipes* mediante cattura manuale notturna. Di ogni gambero sono stati registrati: sesso, lunghezza del cefalotorace, peso e l'eventuale presenza di lesioni. Tutti i soggetti sono stati sottoposti ad un prelievo non invasivo mediante tampone cuticolare e immediatamente rilasciati nell'ambiente. Per quanto concerne *P. clarkii*, 33 esemplari sono stati catturati nel Fontanile del Mirasole, mediante nasse con esche attrattive, e quindi congelati per le successive analisi. La ricerca di *A. astaci* è stata eseguita mediante metodica qPCR (Vrålstad et al., 2009) su DNA estratto dai tamponi cuticolari e, in *P. clarkii*, estratto da porzioni di cuticola prelevata da telson, uropodi, addome, e articolazioni dei pereopodi.

I 29 tamponi prelevati da *A. pallipes* sono risultati negativi per *A. astaci* nonostante il riscontro, in numerosi esemplari, di ulcere melanizzate e di amputazioni di arti o parti di essi. Un singolo esemplare di *P. clarkii* proveniente dall'area più meridionale del parco è risultato invece positivo, evidenziando la circolazione di *A. astaci* nella popolazione alloctona.

Elevato è il rischio di diffusione di *A. astaci* ai corsi d'acqua ritenuti indenni in considerazione dell'elevata densità della popolazione di *A. pallipes*, ospite sensibile, e alla relativa vicinanza spaziale della popolazione alloctona, *carrier* verificata.

Appare quindi necessario monitorare in futuro la popolazione autoctona per evidenziare possibili episodi di mortalità ed adottare opportune strategie di contenimento e sorveglianza dei gamberi alloctoni.

INFESTAZIONI DA *MARITREMA OOCYSTA* (DIGENEA: MICROPHALLIDAE) IN *PALAEMON* SPP. (DECAPODA: PALAEMONIDAE) DELLE VALLI DI COMACCHIO

Massanova O.¹, Gustinelli A.¹, Caffara M.¹, Quaglio F.², Trevisanato R.², Pretto T.³, Fioravanti M.L.¹

¹Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum Università di Bologna; ²Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione, Università di Padova; ³Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

I gamberetti di laguna del genere *Palaemon*, pur presentando un'importanza commerciale limitata a determinate aree geografiche quali ad esempio le zone lagunari del Delta del Po, rivestono un ruolo essenziale all'interno degli ecosistemi acquatici dal punto di vista ecologico, biologico e conservazionistico, disponendosi in posizione strategica all'interno della catena trofica come agenti regolatori della flora e della microfauna locale e come prede di vertebrati quali pesci e uccelli acquatici. *Palaemon* spp., parimenti ad altri invertebrati acquatici, possono essere ospiti intermedi idonei all'interno dei cicli biologici complessi di numerosi elminti parassiti eteroxeni che sfruttano la catena alimentare quale via di trasmissione e mantenimento all'interno di un determinato ecosistema. Per quanto riguarda le principali specie di *Palaemon* presenti nell'areale delle valli di Comacchio, le informazioni scientifiche sulla loro parassitofauna sono completamente assenti, e peraltro molto scarse anche a livello nazionale e sovranazionale. Alla luce dei risultati preliminari di uno studio che aveva permesso di evidenziare la presenza di metacercarie di digenei Microphallidae a carico della corda nervosa di *P. adspersus* e *P. elegans*, scopo del presente lavoro è stato quello di condurre un accurato studio morfologico dei parassiti rinvenuti a fini identificativi e studiarne i tassi di diffusione, anche in relazione alla stagionalità, nelle popolazioni di gamberetti di laguna del Delta del Po.

Sono stati effettuati due campionamenti, uno nell'estate 2017 ed uno nell'inverno 2018, esaminando in totale 210 gamberetti, 200 appartenenti alla specie più comune *P. adspersus* e 10 alla specie *P. elegans*. Tutti gli esemplari sono stati pesati, misurati e sottoposti ad analisi parassitologiche qualitative e quantitative. I parassiti digenei rinvenuti allo stadio di metacercaria a livello della corda nervosa sono stati oggetto di studio morfometrico volto alla loro identificazione. Venti esemplari sono stati fissati in formalina tamponata al 10% per l'esame istologico.

I risultati ottenuti hanno evidenziato valori di positività del 100% per la presenza di metacercarie nei gamberetti esaminati. Importanti differenze dei valori d'intensità di infestazione sono state osservate sia in relazione alle dimensioni degli esemplari che alla stagionalità, con valori maggiori negli esemplari >5cm e nel periodo estivo. Sulla base delle caratteristiche morfologiche, rilevate e comparate con quanto disponibile in letteratura, è stato possibile ascrivere il parassita alla specie *Maritrema oocysta* (Digenea: Microphallidae), confermando quanto emerso dalle analisi molecolari condotte nelle indagini precedenti. All'esame istologico la presenza di metacercarie è stata osservata a carico del sistema nervoso centrale e periferico con localizzazione nel tessuto della massa gangliare cerebrale, nella catena nervosa toracica e nella corda nervosa addominale. In questi distretti non si evidenziavano alterazioni significative. In alcuni esemplari la presenza di metacercarie si estendeva al perinervio e la guaina appariva ispessita e vacuolizzata con presenza di materiale amorfo eosinofilo riferibile ad essudato. Lo studio ha permesso di ottenere dati di estremo interesse sull'epidemiologia dei digenei Microphallidae in *Palaemon adspersus* e *P. elegans* sul nostro territorio. Alla luce degli elevati valori di prevalenza e di intensità di infestazione media rilevati nei gamberetti esaminati, si può ipotizzare che nelle Valli di Comacchio *M. oocysta* riesca a compiere un ciclo di sviluppo "regolare" a tre ospiti, avendo a disposizione un elevato numero di *Palaemon* spp. da sfruttare come secondi ospiti intermedi, contrariamente a quanto riportato in letteratura, dove si ipotizza che questa specie riesca a "saltare" il secondo ospite intermedio crostaceo in ecosistemi non favorevoli. Il particolare tropismo del parassita per il sistema nervoso centrale potrebbe inoltre risultare una strategia evolutiva che, compromettendo la mobilità e la capacità di fuga dell'ospite, faciliterebbe la predazione da parte dell'ospite definitivo rappresentato da un uccello acquatico.

BIOCIDI INNOVATIVI ED ECOSOSTENIBILI: EFFETTI DEL DETAROX® AP SUI BIOMARKERS DI STRESS OSSIDATIVO IN *SINANODONTA WOODIANA*

Magara G.¹, Sangsawang A.², Menconi V.³, Kovitvadhi U.², Caldaroni B.¹, Salvatori A.¹, Scoparo M.¹, Pastorino P.^{3,4}, Barbero R.³, Dörr A.J.M.¹, Gasco L.⁵, Prearo M.³, Elia A.C.¹

¹Dipartimento di Chimica, Biologia e Biotecnologie, Università degli Studi di Perugia, Perugia; ²Department of Zoology, Faculty of Science Kasetsart University, Thailand; ³Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; ⁴Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste, Trieste; ⁵Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari (DISAFA), Università di Torino, Torino

Il Detarox® AP è un disinfettante con un ampio spettro antimicrobico, la cui composizione è data dal 20% di perossido di idrogeno, 5% di acido peracetico e 10% di acido acetico. Grazie al suo basso rapporto molare $\text{CH}_3\text{COOOH}:\text{H}_2\text{O}_2$, ed alle proporzioni rispettate nella formulazione, il Detarox® AP rientrerebbe tra i biocidi, a base di acido peracetico e perossido di idrogeno, più efficaci e meno tossici. L'attività biocida di questo prodotto è stata testata secondo le norme UNI EN 1040, 1275, 1276 e 1650 e se ne consiglia l'utilizzo nel settore industriale e agroalimentare per la disinfezione di manufatti, impianti e attrezzature. Tuttavia, sebbene la sua efficacia contro miceti e protozoi acquatici sia stata comprovata, scarse sono le informazioni sulla tossicità del Detarox® AP sugli organismi acquatici e addirittura assenti sui molluschi. Pertanto, lo scopo del presente studio è stato quello di verificare l'effetto del Detarox® AP su alcuni principali biomarcatori di stress ossidativo nel mollusco dulciacquicolo *Sinanodonta woodiana*. Tale mollusco ricopre un ruolo fondamentale nel settore ambientale, nonché in quello agroalimentare, in cui rappresenta un'importante risorsa economica per molti Paesi extra-europei.

La sperimentazione è stata condotta presso il Centro di allevamento sperimentale del Dipartimento di Scienze Zootecniche della Facoltà di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari dell'Università di Torino. Gli esemplari di *Sinanodonta* sono stati esposti per 14 giorni a due concentrazioni subletali di Detarox® AP, 3 e 60 µg/L. La concentrazione di 3 µg/L è quella attualmente utilizzata negli impianti di acquacoltura. Nessun evento di mortalità si è verificato per l'intera durata della sperimentazione.

Da ogni gruppo sperimentale di 12 esemplari ciascuno, compreso il controllo, sono stati prelevati 6 molluschi ai due *endpoint* stabiliti (7 e 14 giorni). Le valutazioni dei biomarcatori di stress ossidativo, superossido dismutasi (SOD), catalasi (CAT) e glutatione perossidasi (GPx), sono state condotte sulla frazione citosolica della ghiandola digestiva.

Sebbene il Detarox® AP non abbia causato importanti variazioni dei livelli enzimatici di SOD e GPx, una transiente e lieve diminuzione dell'attività di CAT è stata registrata in questi esemplari. Tale inibizione è verosimilmente la conseguenza dell'attività proossidante della composizione del composto in esame.

In conclusione, i nostri risultati suggeriscono che il Detarox® AP, alle due concentrazioni testate, influenzi lievemente la risposta dei principali biomarcatori di stress ossidativo. Pertanto questo biocida potrebbe rappresentare una valida alternativa *eco-friendly* ai disinfettanti attualmente impiegati negli impianti di acquacoltura. Inoltre, data la proprietà di acido peracetico e perossido di idrogeno di scindersi completamente in composti non tossici in acqua, il Detarox® AP potrebbe rappresentare una scelta vantaggiosa anche in termini di sostenibilità ambientale.

VALUTAZIONE ISTOLOGICA DEL FEGATO DI RANE PESCATRICI (*LOPHIUS PISCATORIUS*) COMMERCIALIZZATE PRESSO IL MERCATO ITTICO DI MILANO

Corti I.¹, Ghisleni G.², Ranghieri V.², Malandra R.³

¹Agenzia di Tutela della Salute dell'Insubria (CO); ²Libero professionista, Mercato Ittico di Milano (MI); ³Responsabile S.S. Mercati Generali, Agenzia di Tutela della Salute della Città Metropolitana di Milano (MI).

La rana pescatrice (*Lophius piscatorius*) è una specie di grande valore commerciale, apprezzata per la coda, le guance e il fegato. Quest'ultimo raggiunge dimensioni importanti ed è di colore da bianco-rosato a giallo-arancione. La rana pescatrice è un pesce che vive nei fondali dove è esposto a numerosi contaminanti ambientali. Il fegato è un organo bersaglio di numerosi inquinanti, che possono provocare lesioni degenerative, infiammatorie e anche neoplastiche. Allo scopo di valutare l'eventuale presenza di tali lesioni patologiche sono stati esaminati istologicamente il fegato di rane pescatrici dal peso complessivo crescente (da 0.5 Kg a 10 Kg). L'esame istologico ha evidenziato la normale omogenea disposizione trabecolare degli epatociti. Nel fegato proveniente dai pesci di maggiore peso/dimensioni è evidente una uniforme vacuolizzazione citoplasmatica dovuta all'accumulo intracellulare di lipidi. Risulta una correlazione diretta fra peso-misura della rana pescatrice e grado di vacuolizzazione lipidica. L'accumulo di lipidi a livello epatico è da ritenersi normale fisiologico, ma non deve essere associato a lesioni degenerative o infiammatorie. A livello ispettivo deve essere posta attenzione all'aspetto macroscopico del fegato, che al di là del colore e delle dimensioni, deve essere omogeneo. L'esame istologico è utile nell'identificare eventuali lesioni, che possono modificare il giudizio sull'idoneità al consumo.

OSSERVAZIONI SULLE PATOLOGIE CARDIACHE DEL CIRCOLO CORONARICO DEL PESCE SPADA (*XIPHIAS GLADIUS*)

Guarda F.¹, Mugetti D.², Pastorino P.², Mignone W.², Garibaldi F.³, Chiappino L.¹, Sereno A.¹ & Capucchio M.T.^{1,4}

¹Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino, Grugliasco (TO); ²Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; ³Dipartimento di Scienze della Terra, dell'Ambiente e della Vita, Università degli Studi di Genova; ⁴ISPA CNR, Grugliasco (Torino).

Le coronariopatie sono importanti cause di mortalità nell'uomo la cui insorgenza dipende da molteplici fattori, tra cui ormonali, genetici e socio-comportamentali. In medicina veterinaria, l'arteriosclerosi coronarica è descritta in molte specie animali, con un progressivo aumento della frequenza di lesioni gravi stenotiche con l'invecchiamento soprattutto nei mammiferi domestici e negli uccelli.

Nei pesci pochi sono i dati disponibili sull'arteriosclerosi coronarica. Dal punto di vista istopatologico si associa a iperplasia della tonaca intima, frammentazione della membrana elastica interna e degenerazione delle cellule muscolari lisce della tonaca media con successiva deposizione di tessuto fibroso. Non sono attualmente disponibili studi sul pesce spada.

Il presente lavoro riporta le alterazioni morfologiche osservate nelle arterie coronariche intra ed extramurali di esemplari di pesce spada regolarmente pescati nel mar Ligure per il consumo umano.

Ottantadue cuori di pesce spada (*Xiphias gladius*) sono stati fissati in formalina tamponata al 10% e sottoposti ad esame macroscopico. Campioni selezionati di atri e ventricoli sono stati inclusi in paraffina e le sezioni istologiche corrispondenti sono state colorate con ematossilina-eosina, Weigert van Gieson, tricromica di Masson, Alcian-PAS e blu di Toluidina.

Nelle coronarie, soprattutto intramurali, sono state evidenziate lesioni proliferative di tonaca intima e media in forma di cuscinetti oppure fenomeni degenerativi-iperplastici di tutta la tonaca media con omogeneizzazione della struttura e rarefazione cellulare, fino ad arrivare a stenosi arteriolare.

Questi fenomeni arteriosclerotici sono da considerarsi particolarmente importanti in quanto potenzialmente imputabili alla senescenza o all'esposizione a fattori stressanti, come ipotizzato dagli stessi autori nei bovini sottoposti a condizioni di allevamento intensivo. Ulteriori studi sono comunque necessari per confermare questa ipotesi.

Main Lecture

LUCI E OMBRE SULLE PATOLOGIE CARDIACHE DEL PESCE SPADA (*Xiphias gladius*)

Guarda F.¹, Mugetti D.², Prearo M.², Capucchio M.T.^{1,3}

¹Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino, Grugliasco (TO); ²Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; ³ISPA CNR, Grugliasco (TO).

Il pesce spada (*Xiphias gladius*) è un pesce osseo marino della famiglia *Xiphiidae* che può raggiungere i 4,5 metri di lunghezza e pesare oltre 400 kg. Come tutti i pesci ossei il suo cuore è dotato di quattro concamerazioni: l'atrio, preceduto dal seno venoso ed il ventricolo a cui fa seguito una cavità muscolare detta bulbo arterioso. Il sangue venoso raggiunge il seno, superando la valvola seno-atriale, passa quindi nell'atrio, dotato di parete muscolare, da dove è spinto nel ventricolo e successivamente nel bulbo arterioso e nell'aorta ventrale; da questo passa alle branchie per ossigenarsi.

Nonostante le notevoli dimensioni di questa specie marina, il cuore è relativamente piccolo: non supera i 10 cm in lunghezza nell'animale adulto. In letteratura poco è disponibile sulla patologia cardiaca dei pesci e non sono presenti lavori specifici sul pesce spada. Gli autori ritengono importante presentare i risultati emersi da uno studio condotto su pesci spada pescati nel Mar Mediterraneo e destinati al consumo umano, in particolar modo per sottolineare il significato delle patologie di questo organo di vitale importanza.

Ottantadue esemplari di entrambi i sessi, provenienti dal Mar Ligure, sono stati eviscerati direttamente sulle imbarcazioni, immediatamente dopo la pesca ed i cuori prelevati e congelati per permettere successivamente l'esecuzione di esami microbiologici ed anatomopatologici.

Gli esami microbiologici eseguiti da tamponi pericardici hanno dato per la maggior parte esito negativo (62 soggetti, P=75,6%). I microrganismi isolati nei restanti soggetti (20 con P=24,4%), identificati per mezzo di spettrometria di massa MALDI-TOF, sono stati così ripartiti: *Acinetobacter baumannii* (1 caso), *Enterococcus faecalis* (4 casi), *Lactococcus garvieae*/L. *lactis* (1 caso) e *Shewanella algae* (1 caso), più 12 microrganismi di natura ambientale non identificati con la metodica utilizzata, indicati come germi non significativi (GNS).

L'esame parassitologico ha permesso di evidenziare la presenza di parassiti in 10 cuori (P=12,2%). Nove casi hanno coinvolto parassiti del genere *Pennella*, mentre nel restante caso erano presenti dei Nematodi. Le lesioni principali osservate all'esame anatomopatologico macroscopico coinvolgevano il pericardio, seguite dalle degenerazioni valvolari; solo 12 cuori (P=14,6%) erano privi di lesioni. In particolare, 56 organi (P=68,3%) hanno mostrato pericardite, da sierosa a fibrinosa cronica, con estese aderenze all'epicardio. Di essi, solo 16 (P=28,6%) erano positivi all'esame batteriologico, mentre 9 avevano infestazioni parassitarie (P=16,1%). Le valvole cardiache hanno mostrato quadri variabili di ispessimento e deformazione dei lembi. Per precisione, in 35 cuori (P=42,7%) le lesioni hanno interessato le valvole atrio-ventricolari, in 16 (P=19,5%) le valvole bulbo-ventricolari, mentre solo in 3 casi (P=3,7%) l'endocardiosi coinvolgeva le valvole seno-atriali.

Atrofia gelatinosa del grasso pericardico è stata osservata in 4 cuori (P=4,9%), con la concomitante presenza di parassiti copepod del genere *Pennella*.

Sezioni di parete del seno venoso, atrio, ventricolo, bulbo arterioso e delle aree con lesioni macroscopiche sono state fissate in formalina tamponata al 10%, incluse in paraffina e processate onde ottenere sezioni istologiche colorate con metodi routinari. L'esame istologico, oltre a confermare le lesioni macroscopiche, ha permesso di rilevare: granulomi tipici dell'ittiofoniasi (4 casi, P=4,9%), focolai di epicardite-miocardite linfoplasmocellulare con o senza fibrosi (10 casi, P=12,2%), necrosi delle miofibre (5 casi, P=6,1%), escrescenze di Lambl a carico delle valvole cardiache (19 casi, P=23,2%) e fenomeni di arteriosclerosi a carico delle coronarie di piccolo e medio calibro.

Il riscontro di una così alta percentuale di pericarditi batteriologicamente negative fa riflettere sulla possibilità di inquinanti ambientali coinvolti in forme fibrinose asettiche a cui gli animali potrebbero essere stati esposti per lungo tempo.

Il significato delle degenerazioni valvolari, comunemente associate all'invecchiamento o alle modificazioni della matrice valvolare, e delle coronariopatie resta da chiarire, anche se l'effetto di stressors ambientali che permette di definirle delle patologie da “*disturbed habitat*”, non può essere escluso.

INDICE PRIMI AUTORI

AUTORE

Agnetti	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche, Perugia</i>	54
Andreatta	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe)</i>	42
Bona	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino</i>	43
Bulfon	<i>Dipartimento di Scienze Agroalimentari, Ambientali e Animali (DI4A) Università degli Studi di Udine</i>	26
Byadgi	<i>Department of Agricultural, Food, Environmental and Animal Sciences (DI4A), University of Udine</i>	27
Capparucci	<i>Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Università degli Studi di Messina</i>	56
Capucchio	<i>Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino</i>	36
Carella	<i>Department of Biology, University of Naples Federico II, MSA, 80126, Naples, Italy.</i>	40,57,58,59
Ciulli	<i>Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum, Università di Bologna, Cesenatico (FC)</i>	38
Corti	<i>Agenzia di Tutela della Salute dell'Insubria (CO)</i>	39,63
De Benedetto	<i>Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Messina</i>	53
Errani	<i>Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie - Università di Bologna</i>	16
Guarda	<i>Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Torino, Grugliasco (TO)</i>	64,65
Gustinelli	<i>Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma mater Studiorum - Università di Bologna</i>	51
Iaria	<i>Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Università di Messina (ME)</i>	37
Leveti	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta</i>	24,49

AUTORE

Manfrin	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)</i>	25
Magara	<i>Dipartimento di Chimica, Biologia e Biotecnologie, Università degli Studi di Perugia, Perugia</i>	62
Mascolo	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana "M. Aleandri"</i>	46
Massanova	<i>Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum Università di Bologna</i>	61
Massimo	<i>Dipartimento di Scienze Agroalimentari, Ambientali e Animali, (DI4A), Università degli Studi di Udine</i>	29
Mazzone	<i>Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Ozzano Dell'Emilia (BO)</i>	30
Menconi	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino</i>	32,50
Mugetti	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino</i>	23,44,45,52
Natale	<i>Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Università di Messina</i>	47
Pascoli	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)</i>	18
Pastorino	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino</i>	21,48
Perolo	<i>Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione, Università degli Studi di Padova, Legnaro (PD)</i>	55
Pretto	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)</i>	19
Salogni	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e Dell'Emila Romagna - Brescia</i>	22
Scaturro	<i>Piscicoltura del Golfo di Gaeta Soc. Agricola a R.L., Gaeta (LT)</i>	31
Sirri	<i>Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna</i>	34

AUTORE

Tedesco	<i>Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum Università di Bologna</i>	33
Toffan	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)</i>	17,20
Tomasoni	<i>Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum Università di Bologna</i>	60
Volpatti	<i>Sezione di Scienze Animali e Veterinarie, Dipartimento di Scienze Agroalimentari, Ambientali e Animali, Università degli Studi di Udine, Udine</i>	28
Volpe	<i>Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Cesenatico (FC)</i>	35